

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Production et purification de trois classes de protéines majeures de la membrane externe (OMPs majeures) de Brucella en vue de leur caractérisation structurale

Baelen, Stéphanie

Award date:
2009

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Production et purification de trois classes de protéines majeures de la
membrane externe (OMPs majeures) de *Brucella* en vue de leur
caractérisation structurale**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**

Stéphanie BAELEN

Janvier 2009

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mes promoteurs, les professeurs Xavier De Bolle et Johan Wouters, de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs. Merci au professeur Xavier De Bolle pour toutes les explications et mises au point des protocoles pour la partie biologie moléculaire et au professeur Johan Wouters pour la partie protéique. Merci aussi à eux de m'avoir guidée tout au long de cette année, pour leur patience et pour le temps précieux consacré à la lecture et à la correction de ce mémoire.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes tutrices, Dr Catherine Michaux et Mme Jenny Pouyez, pour leur accueil, pour leurs nombreux conseils et pour toute l'aide apportée au cours de cette année ce qui m'a permis d'aboutir à ce travail.

A toute l'équipe travaillant aux alentours de ma paillasse (celle d'URBM), Rose-Ma, Anne-Michèle, France, Aurélie et Isabelle, merci de m'avoir supportée presque un an. Merci Rose-Ma de m'avoir appris toutes ces notions pratiques de la biologie moléculaire lors de mes premiers pas en tant que mémorante. Merci Rose-Ma, Anne-Michèle et France pour vos conseils et votre bonne humeur qui ont rendu les journées bien agréables. À vous, les autres mémorants d'URBM, merci pour ces moments partagés. Merci aussi à tous les autres URBMIens qui ont su m'apporter aide et conseil.

À toute l'équipe de CBS (mon autre labo) c'est-à-dire, le professeur J. Wouters, Catherine, Jenny, Christine qui répond toujours à l'appel en cas de besoin, Julie qui m'a supportée en face à face à la paillasse et au bureau, Pierre, Jérémy, Caroline et tout les autres, merci d'avoir si bien accueilli une seconde biologiste.

Merci d'avance aux membres du jury, Dr Isabelle Housen et Aurélien Boland ainsi que les professeurs Thierry Arnould et Eric Depiereux pour le temps qu'ils consacreront à la lecture de ce manuscrit.

Enfin, je ne pourrais m'arrêter ici sans remercier ma famille qui m'a apportée bonheur et soutien tout au long de ma vie et de mes études ainsi que mes ami(e)s et co-kotteuses pour tous ces bons moments passés ensemble.

Bonne lecture !

Production et purification de trois classes de protéines majeures de la membrane externe (OMPs majeures) de *Brucella* en vue de leur caractérisation structurale

BAELEN Stéphanie

Résumé

La membrane externe des bactéries à Gram-négatif est une surface d'interaction privilégiée que ce soit avec l'environnement, d'autres bactéries ou encore un hôte eucaryote. Cette membrane constitue aussi par conséquent une cible thérapeutique potentielle dans le cas de bactéries pathogènes telles que celles appartenant au genre *Brucella*. La caractérisation structurale des protéines de la membrane externe des bactéries, appelées OMPs, vise à une meilleure compréhension de leurs fonctions et de leurs rôles potentiels ou avérés dans la virulence.

Au cours de ce travail, deux classes d'OMPs majeures ont été étudiées, le groupe 2 (de 36 à 38 kDa) comprenant les Omp2a et Omp2b et le groupe 3 (de 25 à 27 kDa et de 31 à 34 kDa) comprenant les Omp25 et Omp31. Quelques hypothèses quant à leurs implications dans la virulence ont été énoncées mais leurs fonctions sont néanmoins largement méconnues.

L'objectif à long terme de ce travail est la résolution des structures 3D à haute résolution de ces protéines, par diffraction aux rayons X. Dans ce but, la construction des plasmides de surexpression a été entreprise pour les Omp25 et Omp31. Concernant Omp2a et Omp2b, à partir des plasmides de surexpression, nous nous sommes attelés à établir les protocoles nécessaires à l'obtention de ces OMPs. Ces protocoles répondent aux conditions nécessaires à l'obtention de cristaux de qualité: (i) en grande quantité par surproduction en corps d'inclusion chez *E. coli*, (ii) de pureté suffisante par chromatographie échangeuse d'anions, (iii) sous forme native nécessitant une étape de renaturation à l'aide de détergent et (iv) en haute concentration. Ces étapes nous ont permis de lancer les premiers essais de cristallogénèse avec l'Omp2a.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteurs: Prof. X. De Bolle, Prof. J. Wouters

Table des matières

INTRODUCTION.....	- 1 -
1 BRÈVE INTRODUCTION SUR BRUCELLA SPP. ET LA BRUCELLOSE	- 1 -
1.1 <i>Historique</i>	- 1 -
1.2 <i>Espèces et biovars</i>	- 1 -
1.3 <i>Symptomatologie de la brucellose</i>	- 2 -
1.4 <i>Pathogénie et membrane externe</i>	- 2 -
2 L'ENVELOPPE DE BRUCELLA.....	- 3 -
2.1 <i>Composition et fonction</i>	- 3 -
2.2 <i>OMVs ou "outer membrane vesicles"</i>	- 5 -
2.2.1 Formation des OMVs	- 5 -
2.2.2 Rôle des OMVs et participation à la virulence	- 6 -
2.2.3 Lien entre OMVs et OMPs	- 6 -
3 DESCRIPTION DES OMPs DE BRUCELLA SPP.	- 7 -
3.1 <i>Protéines majeures de la membrane externe</i>	- 7 -
3.1.1 Groupe 2: Omp2a et Omp2b.....	- 8 -
3.1.2 Groupe 3: Omp25 et Omp31.....	- 8 -
3.2 <i>Protéines mineures de la membrane externe</i>	- 10 -
4 BIOGÈNESE DES OMPs	- 11 -
4.1 <i>Système de chaperonnes: Skp, SurA et DegP</i>	- 11 -
4.2 <i>Insertion en membrane externe des OMPs</i>	- 12 -
4.3 <i>Système de réponse au stress σ^E-dépendant</i>	- 13 -
5 STRUCTURE DES OMPs: PRÉDICTION TOPOLOGIQUE ET CRISTALLOGRAPHIE.....	- 13 -
5.1 <i>Prédiction topologique: de la théorie à la pratique</i>	- 13 -
5.2 <i>Prédictions topologiques d'Omp2a et Omp2b</i>	- 14 -
5.3 <i>Cristallographie de protéines membranaires</i>	- 15 -
5.3.1 Le matériel protéique	- 16 -
5.3.2 Les détergents	- 17 -

OBJECTIF ET STRATEGIES	- 19 -
RESULTATS ET DISCUSSION	- 21 -
1 CONSTRUCTION DES PLASMIDES DE SUREXPRESSION DES OMP25 ET OMP31	- 21 -
1.1 Obtention des séquences codantes par PCR	- 21 -
1.2 Insertion des séquences codantes dans le pGEM easy et séquençage.....	- 22 -
2 VÉRIFICATION DES PLASMIDES DE SUREXPRESSION D'OMP2A ET D'OMP2B ISSUS DE LA THÈSE DE J.-Y. PAQUET.....	- 23 -
2.1 Vérification par PCR.....	- 23 -
2.2 Vérification par restriction diagnostique	- 23 -
3 PRODUCTION, PURIFICATION, RENATURATION ET CRISTALLOGENÈSE D'OMP2A ET D'OMP2B	- 25 -
3.1 Surproduction en corps d'inclusion, renaturation et purification par tamis moléculaire: protocole issu de la thèse de J.-Y. Paquet.....	- 25 -
3.2 Nouveau protocole de purification: chromatographie échangeuse d'ions.....	- 27 -
3.3 Mise au point d'un nouveau protocole de renaturation des Omp2a et Omp2b.....	- 27 -
3.3.1 Choix du détergent et mise au point de la concentration en urée et en OMPs	- 27 -
3.3.2 Mise au point de la concentration en NaCl et en urée.....	- 29 -
3.4 Concentration de l'Omp2a en vue des essais de cristallogenèse.....	- 30 -
3.5 Essais de cristallogenèse sur Omp2a.....	- 32 -
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	- 33 -
1 PROTEINES DE LA MEMBRANE EXTERNE DU GROUPE 3: OMP25 ET OMP31	- 33 -
2 PROTEINES DE LA MEMBRANE EXTERNE DU GROUPE 2: OMP2A ET OMP2B	- 34 -
MATERIEL ET METHODES.....	- 36 -
1 MATERIEL	- 36 -
1.1 Souches et plasmides.....	- 36 -
1.1.1 Souches.....	- 36 -
1.1.2 Plasmides.....	- 36 -
1.2 Milieux de culture, additifs, tampons et solutions	- 37 -
1.2.1 Milieux de culture pour E. coli: Milieu riche Luria Bertani (LB) (Invitrogen).....	- 37 -
1.2.2 Additifs: antibiotiques et autres	- 37 -
1.2.3 Tampons et solutions	- 37 -
2 METHODES	- 39 -

2.1	<i>Techniques relatives aux bactéries</i>	- 39 -
2.1.1	Transformation bactérienne par choc thermique.....	- 39 -
2.1.2	Surexpression protéique en culture bactérienne.....	- 39 -
2.1.3	Lyse bactérienne et lyse des corps d'inclusion.....	- 40 -
2.2	<i>Techniques relatives à l'ADN</i>	- 40 -
2.2.1	Polymerase chain reaction (PCR)	- 40 -
2.2.2	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	- 42 -
2.2.3	Restriction sur plasmide.....	- 42 -
2.2.4	Ligation de plasmide.....	- 43 -
2.2.5	Purification sur colonne.....	- 43 -
2.2.6	Minipréparation de plasmide	- 43 -
2.2.7	Midipréparation de plasmide	- 44 -
2.2.8	Séquençage	- 44 -
2.3	<i>Techniques relatives aux protéines</i>	- 44 -
2.3.1	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	- 44 -
2.3.2	Chromatographie d'exclusion	- 46 -
2.3.3	Dialyse de protéines.....	- 46 -
2.3.4	Chromatographie échangeuse d'anions	- 46 -
2.3.5	Concentration de protéines	- 47 -
2.3.6	Renaturation de protéines	- 48 -
2.3.7	Cristallogénèse.....	- 48 -
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 49 -

Liste des abréviations

Abréviations	Terme entier
A	Adénine
bp	Paire de base
BMEI	<i>Brucella melitensis</i> chromosome I
BMEII	<i>Brucella melitensis</i> chromosome II
BR	<i>Brucella suis</i>
C	Cytosine
CMC	Concentration micellaire critique
DEAE	Diethylaminoethyl
dNTPs	Désoxyribonucléotides
DO ou OD	Densité optique
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
G	Guanine
g	Force gravitationnelle
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
LB	Milieu Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
OMP(s)	<i>Outer membrane protein(s)</i>
OMV(s)	<i>Outer membrane vesicle(s)</i>
rpm	Rotation(s) par minute
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
T	Thymine
U	Unité (enzymatique)

Introduction

1 Brève introduction sur *Brucella* spp. et la brucellose

1.1 Historique

Brucella spp. est l'agent causal de la brucellose, une zoonose qui affecte nombreux mammifères dont l'homme (Gorvel and Moreno 2002). Cette pathologie fut décrite pour la première fois par J.A. Marston, un assistant chirurgien Anglais travaillant en Méditerranée sur l'île de Malte en 1861. Celui-ci décrit les symptômes de la brucellose comme "*gastric remittent fever*" (Marston 1861). Le terme de brucellose a connu beaucoup de synonymes en fonction de la région géographique tels que fièvre Méditerranéenne, fièvre de Malte, fièvre de Gibraltar ou encore la fièvre de Chypre. Jusqu'en 1887, l'origine de la brucellose n'était pas connue. Un médecin Ecossais, David Bruce, isola la bactérie pathogène à partir de rates de soldats stationnés sur l'île de Malte et nomma cet organisme, trouvé en grand nombre dans ces organes, *Micrococcus melitensis* (Bruce 1887). Cette dernière fut renommée *Brucella melitensis* par Meyer et Shaw en 1920 permettant le regroupement avec *Brucella abortus* (Meyer and Shaw 1920).

1.2 Espèces et biovars

Brucella spp. est une α -2 protéobactérie, et donc une bactérie À Gram-négatif, pour laquelle 6 espèces sont distinguées selon leurs hôtes préférentiels, à savoir: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* et *B. canis*. Ces espèces, de pathogénicité variable pour l'homme (Figure 1 issue de (Garin-Bastuji, Hars et al. 2000)), sont subdivisées en biovars ou biotypes utiles d'un point de vue épidémiologique (Moreno and Moriyon 2006). La distinction des différentes espèces et biovars de *Brucella* est réalisée via des tests différentiels basés sur la caractérisation phénotypique des antigènes du LPS (lipopolysaccharide), le type de phages, la sensibilité au colorant, les besoins en CO₂, la production en H₂S et les propriétés métaboliques (Alton, Jones et al. 1988). Il est intéressant de remarquer que pour *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. ovis* et *B. canis*, des marqueurs moléculaires spécifiques ont été identifiés dans les gènes *omp25*, *omp31*, *omp2a* et *omp2b* (Moreno, Cloeckart et al. 2002) (Figure 2). Cette observation suggèrerait que les gènes des protéines de la membrane externe (OMPs pour *outer membrane proteins*) majeures¹ sont sources d'informations taxonomiques pertinentes (Ficht, Bearden et al. 1990; Ficht, Husseinen et al. 1996). Une autre espèce de *Brucella* spp. (*B. maris*) comportant 3 biovars, à moins qu'il ne s'agisse de trois espèces distinctes, ont récemment été découvert(e)s chez des mammifères marins (Jahans, Foster et al. 1997).

¹ Les OMPs majeures (Omp2a-Omp2b, les Omp31 et Omp25 par exemple) sont celles retrouvées en quantité "majeure" dans la membrane externe par opposition aux OMPs mineures telles qu'Omp10, Omp16 ou Omp19.

1.3 Symptomatologie de la brucellose

Brucella spp. pénètre au sein de l'hôte par ingestion, par inhalation, au travers de tissus conjonctifs, par le vagin, par le prépuce ou encore via des abrasions de la peau (Enright 1990). Les différents membres du genre *Brucella* étant proches phylogénétiquement, il n'est dès lors pas étonnant que les symptômes provoqués soient similaires. Aussi, les différences observées sont plus liées à la spécificité de l'hôte qu'à la souche bactérienne, le processus d'infection des différentes espèces de *Brucella* étant assez similaire (Moreno and Moriyon 2006). Chez l'hôte animal, les symptômes principaux sont une fièvre récurrente et des ganglions lymphatiques enflammés, la rate et le foie hypertrophiés. Des symptômes d'arthrite, gastro-intestinaux ou nerveux peuvent également apparaître. Chez l'hôte naturelle gestante, l'infection provoque fréquemment l'avortement au cours du troisième trimestre ce qui libère nombre de *Brucella* permettant la contamination d'autres membres du troupeau. Chez le mâle, le système reproducteur est envahi, ce qui facilite la propagation de la pathologie par voie vénérienne. De plus, le mâle est rendu partiellement ou totalement stérile. Les individus ayant un système immunitaire affaibli ont nombre de leurs organes infectés, notamment le système nerveux central amenant à la mort de l'animal.

Le tableau des symptômes montre l'importance des problèmes économiques provoqués par la brucellose qui est une infection chronique pour laquelle les cas non traités peuvent guérir ou rester porteurs à vie. (Moreno and Moriyon 2006). Le réservoir de *Brucella spp.* étant animal, le contrôle de la brucellose chez l'homme, un hôte accidentel, et son éradication doivent passer par une vaccination animale (Alton 1977) ou l'abattage des animaux infectés. Les infections de *Brucella* chez l'homme présentent la plupart des symptômes précités pour les hôtes naturels à quelques différences idiosyncratiques près (Spink 1956; Young 1983). Comme indiqué dans la Figure 1, l'espèce la plus virulente pour l'homme est *Brucella melitensis* suivi par *Brucella suis* et *Brucella abortus*. La détection de la brucellose chez l'homme est moins évidente que chez l'animal ce qui est essentiellement dû à l'absence de symptômes. La mortalité approche les 2% et est fortement réduite par la prise d'antibiotiques. Toutefois, la brucellose reste une pathologie chronique (Moreno and Moriyon 2006).

1.4 Pathogénie et membrane externe

Brucella spp. est une bactérie intracellulaire facultative qui infecte préférentiellement les macrophages. En effet, ce type de bactérie peut survivre en milieu extracellulaire mais doit infecter un organisme et s'y répliquer en intracellulaire pour subsister (Moreno and Moriyon 2002). L'internalisation d'un pathogène intracellulaire tel que *Brucella* au sein d'une cellule hôte nécessite une interaction de type récepteur-ligand spécifique (Van Nhieu and Sansonetti 2000). Par conséquent, *Brucella* doit comprendre les facteurs de virulence lui permettant l'invasion des cellules (Guzman-Verri, Chaves-Olarte et al. 2001) mais également ceux permettant sa survie au sein de ces cellules et sa progression jusqu'à sa niche de réplication dans les phagocytes professionnels et non-professionnels (Moreno and Moriyon 2006). L'aspect "intracellulaire facultatif" implique également que *Brucella* doit être capable de faire face à deux environnements très distincts. Lorsqu'elle est en extracellulaire, dans le sang ou la lymphe par exemple, *Brucella* est confrontée à toutes sortes de substances bactéricides : des antibiotiques, des anticorps, des éléments du complément et des sécrétions leucocytaires. Pour échapper aux divers mécanismes intracellulaires de destruction des parasites, *Brucella* a dû développer des stratégies d'échappement. Ces deux milieux étant très différents, des changements métaboliques et structuraux doivent intervenir lors du passage d'un milieu à l'autre (Sola-Landa, Pizarro-Cerda et al. 1998).

Encore récemment, aucun facteur de virulence classique n'avait été décrit pour *Brucella* tel que des exotoxines, des cytolysines, une capsule, des fimbriae (pilis bactériens), un flagelle, un plasmide, du LPS endotoxique ou encore des inducteurs de l'apoptose (Gorvel and Moreno 2002). Des approches génétiques visant à la caractérisation physiologique bactérienne de macrophages infectés ont permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans la virulence de *Brucella*, de manière directe ou indirecte. Le premier facteur de virulence mis en évidence est le système de sécrétion de type IV, un analogue au système VirB d'*Agrobacterium tumefaciens* (O'Callaghan, Cazevieuille et al. 1999). Le système de sécrétion de type IV est susceptible d'injecter des toxines dans le cytoplasme de cellules infectées (Ruckdeschel, Machold et al. 1997; Ruckdeschel, Harb et al. 1998). A la suite de la découverte de VirB, le système BvrR/BvrS a été caractérisé chez *Brucella* (Sola-Landa, Pizarro-Cerda et al. 1998). Ce dernier est un système à deux composants comportant un senseur et une protéine régulatrice. Des homologues de ce système sont retrouvés chez d'autres α -protéobactéries associées à des eucaryotes et donc, le système BvrR/BvrS interviendrait dans les modifications d'expression génique liées au changement environnemental. Le système BvrR/BvrS est un homologue au système ChvI/ChvG d'*Agrobacterium tumefaciens* (Guzman-Verri, Manterola et al. 2002) qui provoque la galle du collet, une tumeur, chez les plantes légumineuses (Sola-Landa, Pizarro-Cerda et al. 1998). Le système BvrR/BvrS contrôle notamment l'expression des Omp3a (ou Omp25) et Omp3b (ou Omp22), affectant la perméabilité de la membrane (Manterola, Guzman-Verri et al. 2007), ainsi que la structure du LPS (Guzman-Verri, Manterola et al. 2002; Manterola, Moriyon et al. 2005). Ces éléments de la membrane externe sont discutés plus loin. Il a également été montré que la réduction de l'expression des Omp3a et Omp3b n'est pas le seul effet observé chez un mutant *bvrS* et *bvrR* indiquant que ce système à deux composants est à l'origine d'autres propriétés liées à la virulence de *Brucella* (Manterola, Guzman-Verri et al. 2007).

Les vésicules de membrane externe (OMVs) produites par *Brucella* ont aussi un rôle dans la virulence de cette bactérie. Cette propriété est plus longuement discutée au point 2.2.

2 L'enveloppe de *Brucella*

2.1 Composition et fonction

Les bactéries à Gram-négatif ont une enveloppe composée de deux membranes: la membrane interne et la membrane externe, séparées par le périplasme contenant le peptidoglycane ou muréine. Les deux membranes se distinguent par leur structure et leur composition. La membrane interne est une bicouche de phospholipides. Les protéines membranaires intégrales² qui la composent se présentent sous forme d'hélice- α hydrophobes ou amphiphiles.

La membrane externe est asymétrique et comporte des lipides libres, du LPS et des protéines appelées OMPs (*outer membrane proteins*) (Figure 3). La composition en lipides libres de la membrane externe dépend de la position taxonomique de *Brucella* (Freer, Rojas et al. 1995). La surface exposée vers l'extérieur est composée de LPS, remplaçant les phospholipides qui

² Une protéine membranaire intégrale ou intrinsèque est une protéine fermement ancrée dans la membrane grâce aux interactions entre ses résidus hydrophobes et les phospholipides de la membrane.

sont eux retrouvés à la face périplasmique. Le LPS se compose du lipide A, comportant la région hydrophobe d'ancrage à la membrane, auquel est rattaché le noyau (ou *core*) polysaccharidique. Ce dernier comprend une chaîne polysaccharidique supplémentaire qu'est la chaîne O, un antigène spécifique et variable, synthétisé par les souches lisses uniquement (Nikaido 2003; Moreno and Moriyon 2006). Le genre *Brucella* comprend des espèces lisses (avec la chaîne O) et des espèces rugueuses (sans la chaîne O). Ces phénotypes sont différents des phénotypes mutants lisses ou rugueux (Freer, Rojas et al. 1995). Les chaînes O sont nécessaires pour l'expression de l'entière virulence des souches lisses (Porte, Naroeni et al. 2003). Quant aux espèces naturellement rugueuses de *Brucella* (*B. ovis* et *B. canis*), elles sont virulentes dans leur hôte respectif et chez les animaux de laboratoire (Martin-Martin, Caro-Hernandez et al. 2008). En dehors du rôle antigénique du LPS, diverses études suggèrent que le LPS pourrait être nécessaire à la formation efficace d'OMPs en membrane externe, notamment, dans le cas de l'OmpA, une OMP monomérique d'*E. coli* (Schweizer, Hindennach et al. 1978; Freudl, Schwarz et al. 1986).

Les protéines intégrales de la membrane externe, soit les OMPs, se structurent en tonneau- β composé de brins- β antiparallèles et amphipathiques. Les résidus hydrophiles bordent l'intérieur du tonneau et les hydrophobes en constituent la face extérieure (Koebnik, Locher et al. 2000). La classification des OMPs de *Brucella*, leurs fonctions et biogenèse sont discutés plus loin.

La membrane externe des bactéries à Gram-négatif a pour rôle principal d'être une barrière sélective, contrairement à la membrane interne, et est imperméable aux grosses molécules et aux molécules chargées. Cette barrière permet l'influx, de nutriments par exemple, permet de limiter l'influx de composés tels que les antibiotiques et permet l'efflux de déchets métaboliques ou de toxines tels que les antibiotiques. L'influx au travers de la membrane externe est surtout réalisé par les porines, soit une classe d'OMPs trimériques ayant une activité pore-formatrice, qui sont des pores permettant la diffusion passive non spécifique de petites molécules chargées (Schulz 2002; Delcour 2003; Nikaido 2003). Ce sont les propriétés physiques, tels que leur diamètre ou leurs charges, qui détermineront les molécules capables de diffuser au travers de telle ou telle porine.

D'autres types d'OMPs que les porines sont présents dans la membrane externe et sont parfois nommées "porines" à tort car leur fonction et structure divergent des caractéristiques précitées. Ces OMPs sont notamment des transporteurs spécifiques, nécessitant de l'énergie.

Les bactéries à Gram-négatif, par opposition à celles à Gram-positif, sont celles qui sont le plus souvent caractérisées comme étant multirésistantes aux antibiotiques dans le monde hospitaliers (Blot, Depuydt et al. 2007; Rice 2007). Or chez les bactéries à Gram-négatif, la voie d'entrée principale des antibiotiques de type β -lactames et fluoroquinolones³ sont les porines. Les bactéries (à Gram-négatif) présentent trois stratégies touchant les porines leur permettant de résister aux antibiotiques. La première est de modifier le niveau d'expression de

³ Les β -lactames bloquent la formation de la paroi bactérienne en inhibant l'enzyme transpeptidase impliquée dans la synthèse du peptidoglycane. Les fluoroquinolones interrompent l'activité de l'ADN gyrase bactérienne. Ces antibiotiques, couramment utilisés, ont donc pour effet d'induire une cascade bactéricide (Bryskier, A., Ed. (2005). *Antimicrobials agents: Antibacterials and Antifungals*. Washington, ASM Press, Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, et al. (2007). "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." *Cell* **130**(5): 797-810.).

la porine, une seconde stratégie est de changer le type de porines exprimées et enfin, une dernière stratégie est l'apparition de mutations ou de modifications annihilant les propriétés fonctionnelles de la porine (Pages, James et al. 2008).

2.2 OMVs ou "outer membrane vesicles"

2.2.1 Formation des OMVs

Les bactéries à Gram-négatif, qu'elles soient pathogènes ou non (Mayrand and Grenier 1989; Beveridge, Makin et al. 1997; Li, Clarke et al. 1998; Beveridge 1999), ont la capacité de produire des OMVs (*outer membrane vesicles*) ou vésicules de la membrane externe (parfois nommées "bleps" dans la littérature) ce qui n'est pas le cas des gram-positives. Ces OMVs sont constamment produites au cours de la croissance bactérienne (Beveridge 1999). Toutefois, le maximum de production d'OMVs est obtenu à la fin de phase exponentielle de la croissance comme décrit pour *Escherichia coli* (Hoekstra, van der Laan et al. 1976), *Vibrio cholerae* (Chatterjee and Das 1967) et *Brucella melitensis* (Gamazo and Moriyon 1987). De plus, les OMVs sont plus fréquemment observées au site de division cellulaire (Chatterjee and Das 1967; Hoekstra, van der Laan et al. 1976; Gamazo and Moriyon 1987). Elles apparaissent comme étant des vésicules sphériques de 50 à 250 nm de diamètre (variant en fonction de l'espèce) constituées d'une bicouche membranaire (Beveridge 1999). La formation d'OMVs par les bactéries à Gram-négatif est réalisée par les bactéries planctoniques ou celles comprises dans un biofilm (Beveridge, Makin et al. 1997)⁴ mais aussi les bactéries cultivées dans divers milieux: milieux de culture solide et liquide (Kadurugamuwa and Beveridge 1997) ou par celles dans un environnement naturel (Beveridge, Makin et al. 1997). De plus, la matrice extracellulaire des biofilms comprend également des OMVs (Schooling and Beveridge 2006).

Puisque les OMVs se forment à partir de la membrane externe, il est cohérent que les membranes des OMVs aient une constitution similaire à celle de la membrane externe. Les OMVs comprennent en effet des OMPs, du LPS, des phospholipides et des constituants périplasmiques (Beveridge 1999) (Figure 4 B). Bien que leur mécanisme de formation reste encore inconnu, Beveridge et son équipe ont proposé une hypothèse basée sur le caractère anionique de la membrane externe. En effet, chez *Pseudomonas aeruginosa*, le LPS contient deux types d'antigène O: celui dénommé bande A qui est plus court et neutre et celui dénommé bande B qui est plus long et chargé négativement. Or, les OMVs produites par cette bactérie sont principalement composées de LPS avec l'antigène O de bande B (Kadurugamuwa and Beveridge 1995; Kadurugamuwa and Beveridge 1996; Li, Clarke et al. 1996). L'hypothèse est que la force de répulsion des charges négatives portées par ce type de LPS augmente l'amplitude de courbe de la membrane, facilitant la formation d'OMVs les interactions de charges négatives sont alors plus stables. Malgré cette modification de la membrane, le LPS, les phospholipides et les OMPs restent des constituants intégraux de la membrane des OMVs et l'asymétrie de cette même membrane est préservée (Kadurugamuwa and Beveridge 1995).

⁴ Les bactéries dites "planctoniques" sont celles qui vivent librement, individuellement par opposition à celles qui vivent au sein d'un biofilm. Les biofilms sont des communautés de cellules fixées à un substrat et entourées d'une matrice extracellulaire (Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, et al. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nat Rev Microbiol* 2(2): 95-108.). Cette matrice contient de l'ADN, des débris cellulaires, des polysaccharides, des protéines et des phages et sert de couche protectrice.

La figure ci-contre (Figure 4) montre la formation d'OMVs par la souche *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en microscopie électronique (Beveridge 1999) et un modèle de biogenèse de ces OMVs proposé par Kuehn et Kesty (Kuehn and Kesty 2005).

2.2.2 Rôle des OMVs et participation à la virulence

L'aspect ubiquitaire du phénomène de production d'OMVs par les bactéries à Gram-négatif et le coût métabolique qui en découle sont des arguments indiquant que ce phénomène n'est pas futile et doit avoir des rôles biologiques importants pouvant diverger selon l'espèce (Mashburn-Warren, McLean et al. 2008). Les études réalisées sur diverses espèces de bactéries à Gram-négatif pathogènes ou non, et notamment sur *Brucella melitensis* (Gamazo and Moriyon 1987), indiquent toutes une fonction commune des OMVs: elles sont un moyen par lequel la bactérie peut interagir avec les procaryotes, les eucaryotes et l'environnement (Kuehn and Kesty 2005). Des analyses biochimiques et de caractérisation fonctionnelle des OMVs issues de bactéries pathogènes démontrent que ces dernières ont dévié ce système de sécrétion afin de transporter des facteurs de virulence jusqu'aux cellules hôtes. Les OMVs issues de souches pathogènes contiennent des adhésines, des toxines et des composés modulant l'immunité de l'hôte. Ces OMVs sont également directement impliquées dans la liaison de la bactérie à son hôte et dans son invasion, elles sont à l'origine de cytotoxicité et enfin, elles modulent la réponse immunitaire de l'hôte (Kuehn and Kesty 2005). De plus, que ce soit pour les pathogènes intra- ou extracellulaires, les OMVs sont retrouvées dans divers tissus et même dans les fluides indiquant leur habilité à se disséminer dans une large gamme d'environnements au sein de son hôte (Kuehn and Kesty 2005).

2.2.3 Lien entre OMVs et OMPs

Les OMPs se retrouvant dans la membrane des OMVs sont des antigènes et donc, susceptibles d'activer les cellules immunitaires par les récepteurs Toll-like et d'induire la migration des leucocytes, dont les macrophages (Galdiero, Folgore et al. 1999; Akira, Takeda et al. 2001).

Dans le contexte de combat de l'infection de la mucoviscidose, par exemple, des *Pseudomonas aeruginosa* codant pour la β -lactamase⁵ sont capables d'introduire cette enzyme dans les OMVs qui contiennent des porines au travers desquelles les antibiotiques diffusent facilement. Une fois introduits dans la vésicule, ceux-ci sont alors inactivés par les β -lactamases. Ce mécanisme permet donc de réduire la concentration extracellulaire en antibiotique et permet une meilleure résistance des *P. aeruginosa* (Ciofu, Beveridge et al. 2000). De même, ces OMVs, étant capables de fusionner aux membranes externes d'autres bactéries à Gram-négatif pathogènes (Kadurugamuwa and Beveridge 1999), peuvent transférer la β -lactamase à une autre bactérie incapable de la produire (Beveridge 1999). Par ailleurs, dans le cadre de la résistance aux antibiotiques, une étude a montré la capacité des OMVs à transférer un plasmide codant pour la résistance à un antibiotique entre deux souches de *Neisseria gonorrhoeae* (Dorward, Garon et al. 1989).

C. Gamazo et I. Moryón ont montré que *Brucella melitensis* produit des OMVs, qu'ils nomment "matériel membranaire libre", et que ces OMVs contiennent du LPS, des

⁵ La β -lactamase est une enzyme retrouvée dans le périplasme, notamment de *Pseudomonas aeruginosa*, et qui hydrolyse les antibiotiques de type β -lactames.

phospholipides et de nombreuses OMPs. Ces dernières sont majoritairement des OMPs du groupe 3 (cfr "Description des OMPs de *Brucella* spp."). Le fait qu'aucune OMP du groupe 2 n'a pu être détectée au sein des OMVs de *B. melitensis* (Gamazo and Moriyon 1987; Gamazo, Winter et al. 1989; Boigegrain, Salhi et al. 2004) pourrait s'expliquer par l'aspect majoritaire des OMPs du groupe 3 par rapport aux groupes 1 et 2 dans la membrane externe de cette espèce bactérienne comparativement à *B. abortus* (Santos, Verstrete et al. 1984).

3 Description des OMPs de *Brucella* spp.

3.1 Protéines majeures de la membrane externe

Les protéines majeures de la membrane externe ou OMPs majeures⁶ ont, dans un premier temps, éveillé l'intérêt des chercheurs de part leur aspect antigénique protecteur potentiel. Dans les années 1980, Dubray et son équipe ont été les premiers à l'identifier via l'observation d'un effet protecteur contre la brucellose chez le modèle murin par la fraction insoluble de l'enveloppe bactérienne de *Brucella* (Dubray and Bezard 1980; Dubray and Charriaut 1983; Dubray 1987). Toutefois, d'autres expériences ont montré que les fractions insolubles des souches rugueuses de *B. abortus* et *B. melitensis* n'induisent pas d'effet protecteur contre une infection par les souches lisses et virulentes de *B. abortus* et *B. melitensis*, respectivement, chez la souris (Dubray 1981; Cloeckaert, Jacques et al. 1995). L'hypothèse tirée de ces observations est que la fraction insoluble de l'enveloppe bactérienne qui avait donné un effet protecteur aurait pu être contaminée par du LPS lisse (<1%) qui en petite quantité s'avère être hautement immunogénique (Cloeckaert, Jacques et al. 1995). Par conséquent, les OMPs majeures ont peu ou pas de rôle(s) dans la protection contre les infections par *Brucella* de souche lisse dans le modèle murin et le LPS lisse, pour sa part, y a un rôle important comme démontré via d'autres expérimentations d'immunisation (Montaraz, Winter et al. 1986; Limet, Bosseray et al. 1989; Phillips, Deyoe et al. 1989; Winter, Duncan et al. 1989; Cloeckaert, Jacques et al. 1992; Elzer, Jacobson et al. 1994; Vizcaino and Fernandez-Lago 1994; Cloeckaert, Jacques et al. 1995).

Les OMPs majeures ont été classifiées en fonction de la masse moléculaire monomérique apparente dans le groupe 1 (de 94 ou 88 kDa) (Cloeckaert, de Wergifosse et al. 1990), le groupe 2 (de 36 à 38 kDa) (Ficht, Bearden et al. 1988; Ficht, Bearden et al. 1989; Marquis and Ficht 1993) et le groupe 3 (de 25 à 27 kDa et de 31 à 34 kDa) (de Wergifosse, Lintermans et al. 1995; Vizcaino, Cloeckaert et al. 1996). Le groupe 1 correspond à l'ensemble des OMPs mineures (Cloeckaert, de Wergifosse et al. 1990) qui sont discutées plus loin. Les séquences codantes des OMPs majeures de *Brucella* sont clonées et séquencées. Les protéines produites pour le groupe 2 sont les Omp2a et Omp2b (Ficht, Bearden et al. 1988; Ficht, Bearden et al. 1989; Marquis and Ficht 1993) et pour le groupe 3 de 25 à 27 kDa et de 31 à 34 kDa sont l'Omp25 (de Wergifosse, Lintermans et al. 1995) et l'Omp31 (Vizcaino, Cloeckaert et al. 1996) respectivement.

⁶ Le terme d'OMPs "majeures" fait référence à leur importance quantitative au sein de la paroi bactérienne.

3.1.1 Groupe 2: Omp2a et Omp2b

Les protéines de ce groupe ont été identifiées, par Douglas et son équipe en 1984, comme porines qui semblent s'oligomériser (Douglas, Rosenberg et al. 1984). Ce groupe comprend deux OMPs, les Omp2a et Omp2b, qui partagent 85% d'identités (Verger, Grimont et al. 1985). Leurs séquences codantes sont séparées de 830 bp et sont orientées dans des directions opposées (Paquet 2000; Cloeckeaert, Vizcaino et al. 2002) (Figure 5). Seule l'expression d'*omp2b* a pu être mise en évidence chez *B. abortus* ou chez *E. coli* où ces gènes ont été clonés (Ficht, Bearden et al. 1989). En effet, bien que la séquence codante *omp2a* soit présente dans toutes les souches de *Brucella*, la duplication du gène *omp2* en *omp2a* et *omp2b* étant conservée chez toutes ces espèces (Ficht, Bearden et al. 1990), son expression n'a jamais été détectée et cela devra encore être élucidée (Paquet, Diaz et al. 2001). L'expression d'*omp2a* chez *E. coli* a pu être obtenue en inversant la région intergénique (Ficht, Bearden et al. 1989). Dans cet organisme, les Omp2a et Omp2b sont toutes deux exportées en membrane externe (Marquis and Ficht 1993). Une augmentation de la perméabilité membranaire d'*E. coli* est observée uniquement avec Omp2a. Ceci indiquerait que cette protéine forme un pore dans la membrane externe de cette bactérie. De plus, concernant Omp2b uniquement, cette protéine forme des oligomères résistants à la dénaturation par la chaleur (au delà de 70°C) en présence de SDS ce qui est caractéristique des porines (Marquis and Ficht 1993).

Au niveau fonctionnel, il a été suggéré qu'Omp2a consiste en un pore plus large qu'Omp2b ce qui permettrait un meilleur accès aux nutriments retrouvés en faible concentration dans le phagosome (Marquis and Ficht 1993). Dans sa thèse, J.-Y. Paquet a réalisé des tests de gonflement des liposomes (*liposome swelling assay*) permettant de mesurer le passage de molécules au travers d'une protéine membranaire donnée. Il a ainsi comparé les Omp2a et Omp2b pour leur perméabilité aux sucres. L'expérience a montré qu'Omp2a aurait un pore plus efficace pour ce type de diffusion (Paquet 2000). La prédiction topologique de ces porines de *Brucella*, qui sera plus largement discutée au point 5, montre qu'elles constitueraient en un tonneau β à 16 brins avec de larges boucles exposées à la surface externe (Mobasher, Ficht et al. 1997; Paquet, Vinals et al. 2000). De plus, les boucles exposées par Omp2a portent plus de charges négatives que celles d'Omp2b.

3.1.2 Groupe 3: Omp25 et Omp31

La famille des Omp25 et Omp31 de *Brucella* est composée de sept OMPs homologues (Salhi, Boigegrain et al. 2003; Vizcaino, Caro-Hernandez et al. 2004): Omp25 (ou Omp3a) et Omp31 (BRA0423) et, Omp25b, Omp25c (BR0119), Omp25d (BR0118), Omp31b et Omp22 (ou Omp3b) (BR1284), pour lesquelles peu de choses sont connues⁷ (Caro-Hernandez, Fernandez-Lago et al. 2007). Les Omp25d et Omp22 jouent un rôle fondamental dans la capacité invasive et la multiplication intracellulaire de *Brucella ovis* dans les macrophages et les cellules HeLa (Martin-Martin, Caro-Hernandez et al. 2008). Pour rappel, les Omp25 et

⁷ L'Omp31b est probablement absente de la membrane externe de *B. melitensis*, *B. ovis* et *B. canis*. L'Omp25b ne semble pas présente dans la membrane externe de *B. abortus*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. cetaceae* et *B. pinnipediae*. Enfin, les Omp25c, Omp25d et Omp22 sont conservées chez toutes les souches de *Brucella* (sauf peut-être chez certaines souches de *B. cetaceae*) (Vizcaino, N., P. Caro-Hernandez, et al. (2004). "DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of Brucella spp.: identification of a 1.7-kb inversion in Brucella cetaceae and of a 15.1-kb genomic island, absent from Brucella ovis, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide." *Microbes Infect* 6(9): 821-34.

Omp31 sont les OMPs les plus représentées au sein des OMVs (Gamazo and Moriyon 1987; Gamazo, Winter et al. 1989; Boigegrain, Salhi et al. 2004).

3.1.2.1 *Omp25*

Le gène *omp25* est très conservé au sein des espèces, des biovars et des souches de *Brucella* comme le suggèrent des analyses de type PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Seuls deux marqueurs espèces-spécifiques ont pu être mis en évidence: l'absence d'un site *EcoRV* chez les souches de *B. melitensis* et une petite délétion d'environ 50 paires de base (ou bp) à l'extrémité 3' du gène chez les souches de *B. ovis* (Cloeckaert, Verger et al. 1995). Il est prédit que l'Omp25 native contient huit brins β transmembranaires liés entre eux en alternance par des courts β turns, que l'on suppose orientés vers le périplasme, et de longues boucles externes (Cloeckaert, Vizcaino et al. 2002). L'équipe d'Axel Cloeckaert a tenté de surexprimer l'Omp25, protéine qui n'est pas une porine, sous le contrôle d'un promoteur fort chez *E. coli* (Jubier-Maurin, Boigegrain et al. 2001), et a montré qu'il y avait formation d'OMVs et lyse des cellules bactériennes (Cloeckaert, Verger et al. 1996).

L'Omp25 serait impliquée dans la virulence des *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. ovis* (Edmonds, Cloeckaert et al. 2001; Edmonds, Cloeckaert et al. 2002; Edmonds, Cloeckaert et al. 2002). En effet, lorsque la CDS de cette protéine est inactivée dans les mutants des espèces précitées, la virulence est atténuée chez la souris, la chèvre (*B. melitensis*) et les bovins (*B. ovis*) (Edmonds, Cloeckaert et al. 2001; Edmonds, Cloeckaert et al. 2002). La seule fonction d'Omp25 qui a pu être reliée à la virulence de *Brucella*, jusqu'à présent, est sa capacité à empêcher ou à inhiber la sécrétion par les macrophages humains de TNF- α , ou *tumor necrosis factor*, une cytokine pro-inflammatoire, induite par la phagocytose de *Brucella*. Cette dernière parvient à entraver la production du TNF- α en modulant de manière spécifique la stimulation du macrophage à l'aide de facteur(s) protéique(s). Ce ou ces dernier(s) sont également retrouvé(s) dans le surnageant de culture. Le TNF- α induit des activités antibactériennes des macrophages, stimule la présentation d'antigènes à la surface des macrophages et par conséquent, initie la réponse immunitaire spécifique. L'inhibition de la production de cette cytokine permet donc le développement intracellulaire de *Brucella* (Jubier-Maurin, Boigegrain et al. 2001).

3.1.2.2 *Omp31*

L'Omp31 partage 34% d'identités avec l'Omp25 décrite ci-dessus. La production d'Omp31 chez *E. coli*, tout comme celle issue de culture de *B. melitensis*, présente un profil de migration sur SDS-PAGE multi-bandes qui n'a pu être expliqué (Vizcaino, Cloeckaert et al. 1996). La proportion de protéines du groupe 3 par rapport à celles du groupe 2 est plus importante chez *B. melitensis* que chez *B. abortus*, ce qui serait dû à la réduction quantitative de protéines du groupe 2 chez *B. melitensis* (Santos, Verstrete et al. 1984). A. Cloeckaert pose l'hypothèse que cette réduction en Omp2b chez *B. melitensis* pourrait être en partie compensée par l'Omp31 dont la caractérisation fonctionnelle éclairerait ce point (Cloeckaert, Vizcaino et al. 2002). La topologie prédictive d'Omp31 présente cette protéine comme un tonneau β comprenant huit brins dont les boucles exposées en surface seraient plus longues que celles d'Omp25 (Vizcaino, Cloeckaert et al. 2001; Vizcaino, Kittelberger et al. 2001).

Au niveau fonctionnel, cette OMP présente plusieurs caractéristiques portant à croire qu'il s'agit d'une porine. L'Omp31 est notamment capable de former des oligomères résistants à la dénaturation par le SDS à basse température que ce soit chez *E. coli* ou chez *B. melitensis* (Cloeckaert, Vizcaino et al. 2002). Il a également été suggéré qu'Omp31 puisse être impliquée

dans l'export de l'EPS ou exopolysaccharide, le composant majeur des biofilms, et peut-être, dans d'autres aspects de la production de l'EPS (Uzureau, Godefroid et al. 2007).

Afin d'éviter les infections bactériennes, les mammifères limitent la disponibilité en fer inorganique. Pour pallier à ce problème, les bactéries utilisent l'hème, la ressource la plus importante en fer chez les mammifères, comme source de fer (Andrews, Robinson et al. 2003). En milieu aqueux, cette ressource en fer se trouve sous sa forme oxydée qu'est l'hémine. (Genco and Dixon 2001). Or, l'Omp31 partage 31,7% d'identités avec l'HbpA, une *haemin-binding surface protein* de *Bartonella quintana* (Carroll, Coleman et al. 2000). L'Omp31 a dès lors été étudiée pour cette activité. Il s'avère qu'Omp31 de *Brucella* est une HBP, ou protéine liant l'hémine, et que l'expression de cette OMP est induite par une limitation en fer telle que celle retrouvée en intracellulaire (Delpino, Cassataro et al. 2006).

3.2 Protéines mineures de la membrane externe

Ce groupe comprend quatre OMPs: Omp10, Omp16, Omp19 et Omp89 (ou Omp1) (Cloekaert, de Wergifosse et al. 1990; Tibor, Weynants et al. 1994). Les Omp10, Omp19 (Tibor, Saman et al. 1996) et Omp16 (Tibor, Weynants et al. 1994) ont été détectées dans 34 souches testées de *Brucella* représentant les six espèces ainsi que l'ensemble de leur biovars. Le clonage, le séquençage et l'expression en *E. coli* des séquences codantes de ces OMPs ont été réalisées. La quatrième OMP mineure, l'Omp89, a également été séquencée⁸ (Bearden ; Cloekaert, de Wergifosse et al. 1990). L'Omp16 présente des similarités significatives avec trois autres lipoprotéines associées au peptidoglycane (*peptidoglycan-associated proteins* ou PALs) d'autres bactéries à Gram-négatif (Tibor, Weynants et al. 1994). Pour les Omp10 et Omp19, seules deux protéines homologues issues de *Mesorhizobium loti* ont pu être ressorties des bases de données de séquences (Kaneko, Nakamura et al. 2000). Par ailleurs, la première lipoprotéine identifiée chez *Brucella* a été l'équivalente à la lipoprotéine de Braun, associée au peptidoglycane ou muréine (Gomez-Miguel and Moriyon 1986), partiellement exposée à la surface des souches lisses de *B. abortus* et *B. melitensis* (Gomez-Miguel, Moriyon et al. 1987). Les Omp10, Omp16 et Omp19 possèdent au sein du peptide signal en N-terminal, un tétrapeptide ayant un haut degré de similarité avec la séquence consensus requise pour les modifications et les transformations des précurseurs de lipoprotéines bactériens (Hayashi and Wu 1990). Sur base de ces informations, des recherches expérimentales ont permis de mettre en évidence que ces trois OMPs sont des lipoprotéines puisqu'elles répondent à trois critères définissant une lipoprotéine (Tibor, Decelle et al. 1999).

En 2002, des recherches sur les effets d'Omp10 et Omp19 sur la virulence de *Brucella* ont été réalisées (Tibor, Wansard et al. 2002). Il en ressort que *B. abortus* muté pour le gène *omp10* voit sa virulence fortement réduite et que le seul effet détecté pour ce mutant sur les propriétés de la membrane externe est une augmentation de la sensibilité au déoxycholate de sodium. De plus, la surproduction d'Omp10 chez *Brucella* à des fins de complémentation du mutant *omp10* ne fonctionne pas. En ce qui concerne Omp19, le mutant présente un taux de croissance diminué, du moins lors de l'infection de cellules HeLa. La délétion d'Omp19 aurait un effet indirect sur l'interaction entre la membrane externe de *Brucella* et la polymyxine B, un antibiotique utilisé lors d'une infection par des bactéries à Gram-négatif résistantes.

⁸ Séquence disponible dans la base de données GenBank au numéro de référence U51683.

4 Biogenèse des OMPs

Contrairement à la membrane interne, la membrane externe ne permet pas la formation d'un gradient de protons comme source d'énergie, raison pour laquelle la biogenèse des OMPs est restée longtemps non résolue. Les études sur la biogenèse des OMPs ont principalement été réalisées sur *E. coli*, *Salmonella enterica* et *Neisseria meningitidis*. Chez cette dernière, des différences importantes dans les mécanismes de base par rapport à *E. coli* ont été observées. Par conséquent, les informations fournies par *E. coli* sont à utiliser avec discernement et à ne pas généraliser à toutes les bactéries à Gram-négatif (Bos, Robert et al. 2007).

Tous les composants de la membrane externe sont synthétisés dans le cytoplasme ou à la face interne de la membrane interne. Les OMPs y sont donc également synthétisés sous forme de précurseurs ayant un peptide signal en N-terminal nécessaire à leur transport au travers de la membrane interne. Deux machineries ont été décrites pour ce transport: le système Sec transportant les protéines non natives (de Keyser, van der Does et al. 2003) et le système Tat transportant les protéines sous forme native (Lee, Tullman-Ercek et al. 2006). Les OMPs utilisent le système Sec et par conséquent, atteignent le périplasme sous forme dénaturée. Une fois dans le périplasme, les OMPs sont dirigées vers une machinerie de translocation située dans la membrane externe. Cette machinerie se compose d'une OMP intégrale, l'Omp85 ou YaeT⁹, et de quatre lipoprotéines: NlpB, YfgL, YfiO (Wu, Malinverni et al. 2005) et SmpA (Sklar, Wu et al. 2007). Cependant, les OMPs étant partiellement dénaturées, seraient les cibles de protéases périplasmiques et donc, la bactérie a dû développer un système permettant le transport de ces OMPs jusqu'à la membrane externe sans qu'elles ne soient dégradées et sans qu'elles ne stimulent le système de réponse au stress σ^E (Alba and Gross 2004). C'est ainsi que trois chaperonnes ont été mises en évidence dans le guidage des OMPs au travers du périplasme: SurA, Skp et DegP (Chen and Henning 1996; Rouviere and Gross 1996; Rizzitello, Harper et al. 2001; Sklar, Wu et al. 2007).

4.1 Système de chaperonnes: Skp, SurA et DegP

La chaperonne Skp, pour *seventeen-kilodalton protein*, est une protéine homotrimérique formant des complexes de rapport 1:1 avec les OMPs dès leur entrée dans le périplasme. Le complexe OMP-Skp est stable, pH dépendant et se lie au LPS impliquant un changement topologique qui faciliterait le transport jusqu'à la membrane externe. (Qu, Mayer et al. 2007).

La protéine SurA a une activité de chaperonne ainsi que celle d'une peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase grâce à ses deux domaines peptidyl-prolyl isomérase (PPIase) (Lazar and Kolter 1996). SurA, liant préférentiellement les OMPs non natives (Behrens, Maier et al. 2001), lie les peptides riches en résidus aromatiques et plus particulièrement les motifs Ar-Ar ou Ar-X-Ar¹⁰. Ces motifs sont fréquents au sein des brins β transmembranaire des OMPs (Hennecke, Nolte et al. 2005). Différentes expérimentations montrent que SurA travaillerait sur une voie parallèle à Skp et DegP (Sklar, Wu et al. 2007) ou séquentiellement à Skp. Selon cette seconde hypothèse, Skp empêcherait l'agrégation d'OMPs non natives et SurA aiderait au repliement des OMPs (Figure 6) (Bos, Robert et al. 2007).

⁹ Le nom Omp85 correspond à l'OMP retrouvée chez *N. meningitidis* et le terme YaeT correspond à la même OMP chez *E. coli*.

¹⁰ "Ar" correspond à un résidu aromatique et "X" correspond à un autre résidu quelconque.

La protéine DegP est un cas particulier alliant une activité de protéase, dégradant les protéines non ou mal repliées, et une activité de chaperonne. Elle est capable de passer d'une activité à l'autre de manière finement régulée (Spiess, Beil et al. 1999; Iwanczyk, Damjanovic et al. 2007; Meltzer, Hasenbein et al. 2008). Dans le périplasme, le compartiment central de cette protéine est utilisé pour enfermer les OMPs dénaturées et pour les compartimenter entre les voies de renaturation et de dégradation (Krojer, Sawa et al. 2008). DegP appartient à la famille des sérines protéases HtrA impliquées dans la dégradation des protéines périplasmiques mal renaturées. Les HtrA comprennent un ou deux domaines PDZ¹¹ en C-terminal permettant l'interaction avec les protéines à dégrader (Harris and Lim 2001).

4.2 Insertion en membrane externe des OMPs

L'Omp85 est essentielle à la survie de la bactérie et d'ailleurs, un homologue au gène *omp85* est retrouvé chez chacune des bactéries à Gram-négatif dont la séquence génomique est disponible (Voulhoux and Tommassen 2004). De plus, le gène *omp85* est à proximité du gène *skp* (cfr ci-dessus) et du gène *rseP* ou *yaeL* encodant pour une protéase impliquée dans le système de réponse au stress σ^E -dépendant chez *E. coli*. Ce système de réponse au stress est induit lors de l'accumulation d'OMPs dénaturées dans le périplasme. Diverses expérimentations, utilisant des mutants délétés pour Omp85 sur différentes souches et même sur des mitochondries dont le génome codent pour des OMPs, montrent l'aspect hautement conservé de l'insertion en membrane externe des OMPs et de l'implication essentielle d'Omp85 (Bos, Robert et al. 2007). Cependant, les mutants pour Omp85 chez *N. meningitidis* et chez *E. coli* réagissent différemment. Chez *N. meningitidis*, les OMPs dénaturées s'accumulent dans le périplasme (Voulhoux, Bos et al. 2003) alors que chez *E. coli*, cette mutation réduit fortement quantitativement les OMPs détectables en membrane externe (Werner and Misra 2005; Wu, Malinverni et al. 2005). Cette différence serait due à l'absence du système de réponse au stress σ^E -dépendant chez *N. meningitidis* (Bos, Robert et al. 2007) (cfr point 4.3).

Comme cité précédemment, Omp85 forme un complexe avec quatre lipoprotéines: NlpB, SmpA, YfgL et YfiO (Wu, Malinverni et al. 2005). YfgL et YfiO interagissent directement avec l'Omp85 tandis que NlpB est associé au complexe par l'intermédiaire d'YfiO (Malinverni, Werner et al. 2006) (Figure 6 où SmpA n'est pas représenté). YfgL et YfiO pourraient moduler le peptidoglycane afin de faciliter le passage de l'OMP à travers celui-ci tandis que NlpB semble jouer un rôle direct dans l'assemblage d'OMP et peut-être de manière redondante à l'action de SurA (Bos, Robert et al. 2007).

L'Omp85 forme un canal ionique dont l'efficacité est accrue par la liaison d'OMPs non natives. Cette liaison se fait spécifiquement entre un motif en C-terminal de l'OMP non native, retrouvé chez les porines, récepteurs, enzymes et autotransporteurs, et l'Omp85 (Robert, Volokhina et al. 2006). Le domaine reconnu par l'Omp85 est le même que celui reconnu par le domaine PDZ de la protéase DegS lors d'accumulation d'OMPs dénaturées (Walsh, Alba et al. 2003).

Sur base de toutes ces informations, M.P. Bos, V. Robert et J. Tommassen ont proposé un modèle pour la biogenèse des OMPs schématisé à la Figure 6 (Bos, Robert et al. 2007). Suite

¹¹ Cette dénomination provient des trois protéines au sein desquels ce domaine a pour la première fois été identifié: PSD-95,Dlg et ZO-1.

au transport au travers la membrane interne par le système Sec, l'OMP est immédiatement liée à Skp. Ce dernier faciliterait la libération de l'OMP dans le périplasma ou au complexe Omp85 et éviterait son agrégation. Le motif en C-terminal de l'OMP permet la liaison à l'Omp85, probablement à son domaine POTRA (*polypeptide transport associated*), un domaine conservé et répété présenté à la surface périplasmique. Cette liaison initie le repliement de l'OMP et de là, la libération de Skp (De Cock, Schafer et al. 1999). L'initiation du repliement peut être aidé par l'activité des chaperonnes présumées des domaines POTRA et par les chaperonnes périplasmiques telles que SurA. Comme il a déjà été énoncé, la liaison de l'OMP à l'Omp85 induit une modification conformationnelle, elle-même impliquant une augmentation de l'activité pore-formatrice de l'Omp85 (Robert, Volokhina et al. 2006). Ce changement conformationnel de l'Omp85 permet l'insertion de l'OMP en membrane externe. Finalement, la dissociation des membres du complexe Omp85 permet la libération de l'OMP dans la membrane. L'oligomérisation de certaines protéines telles que les porines, ne se réalise qu'après insertion en membrane. De derniers changements de conformation liés aux boucles exposés à la face externe peuvent être induits par des interactions LPS-dépendantes. Jusqu'à présent, les recherches sur les rôles précis des lipoprotéines du complexe Omp85 n'ont pas permis d'en percevoir le mécanisme.

4.3 Système de réponse au stress σ^E -dépendant

Chez *E. coli*, l'accumulation d'OMPs dénaturées dans le périplasma induit une réponse de stress (Figure 7). La liaison du motif en C-terminal des OMPs par le domaine PDZ de DegS met en route une cascade protéolytique en permettant la dimérisation entre DegS et le complexe RseP. Ce dernier est lié, côté cytoplasme, au facteur de transcription σ^E qui, une fois la dimérisation établie, sera libéré dans le cytoplasme. Le facteur de transcription σ^E pourrait dès lors se lier à l'ARN polymérase permettant la transcription de toute une série de gènes liés au stress déclencheur: des chaperonnes, Skp et SurA par exemple, et la protéase DegP. Ces protéines permettront de rétablir l'ordre au niveau du périplasma soit en repliant correctement les OMPs, soit en les dégradant (Bos, Robert et al. 2007). De plus chez les *enterobacteriaceae*, l'expression d'OMPs est momentanément interrompue grâce à l'induction, par ce même système σ^E , de la production de petits ARN empêchant la traduction des OMPs (Figueroa-Bossi, Lemire et al. 2006; Johansen, Rasmussen et al. 2006; Papenfort, Pfeiffer et al. 2006).

5 Structure des OMPs: prédiction topologique et cristallographie

5.1 Prédiction topologique: de la théorie à la pratique

La cristallographie fournit des structures 3D de protéines à haute résolution. Cependant la détermination de ces structures ne suit pas le rythme d'apparition des séquences de protéines dans les bases de données, d'où l'intérêt de développer des méthodes théoriques de prédiction structurale (von Heijne and Manoil 1990; Hubbard, Park et al. 1996). Une structure 3D peut être prédite par la modélisation par homologie qui s'applique aux protéines globulaires mais peut être adaptée aux OMPs (Alberti, Rodriguez-Quinones et al. 1995; Derrick, Urwin et al. 1999). Toutefois, ce type de modélisation nécessite de connaître les structures cristallographiques d'OMPs homologues or, l'homologie entre OMPs est souvent faible même entre espèces proches. Par ailleurs, il est difficile de prédire les repliements des boucles extramembranaires qui peuvent s'étirer ou se replier de sorte à obturer le pore. Par conséquent,

la prédiction topologique (structure 2D) est une bonne alternative puisqu'elle permet notamment de déterminer les séquences formant les boucles potentiellement antigéniques. Ces dernières sont d'un grand intérêt pour le développement de vaccins, une clé importante dans la recherche sur *Brucella*. La prédiction topologique permet également de situer dans l'espace les séquences variables (Derrick, Urwin et al. 1999) et d'interpréter les données expérimentales d'interaction entre protéines, de fonction ... (Paquet 2000)

La topologie des OMPs peut être obtenue théoriquement ou expérimentalement. En ce qui concerne les prédictions topologiques théoriques, divers algorithmes ont été développés et améliorés à la suite des premières résolutions cristallographiques. Les différentes méthodes prédisent une structure secondaire dite "à deux états", c'est-à-dire que chaque résidu est déterminé comme appartenant soit à un brin β transmembranaire soit à une boucle reliant deux brins (Paquet 2000). Ainsi, pour repérer un brin β transmembranaire, des algorithmes tenant compte du caractère amphipathique¹² des acides aminés ont été mis au point (Jahnig 1990). Toutefois, il arrive que des résidus à chaîne latérale hydrophobe pointent vers la lumière du tonneau car protégés par une boucle extramembranaire (Paquet 2000). Il est ainsi possible de prédire la topologie de porines sachant que généralement les longues boucles sont exposées vers l'extérieur tandis que les boucles courtes sont exposées à la face périplasmique (Schirmer and Cowan 1993).

En ce qui concerne les méthodes expérimentales, telles que l'insertion ou la délétion de séquence (cfr paragraphe suivant), elles indiquent l'appartenance à un brin β transmembranaire ou à une boucle (longue ou courte) de zones ponctuelles de la protéine testée. Par conséquent, la topologie 2D obtenue est dite de "basse résolution" (Diederichs, Freigang et al. 1998) raison pour laquelle l'expérimental est combiné au théorique. Mais alors quels avantages retirés de ces expérimentations? Premièrement, la confiance en la topologie prédite expérimentalement est plus accrue (Newton, Klebba et al. 1996) et deuxièmement, les données fonctionnelles recueillies sont déterminantes. Quand bien même la résolution cristallographique est disponible ultérieurement, les données obtenues expérimentalement peuvent toujours être visualisées sous un autre angle (Paquet 2000).

L'une d'elles est l'utilisation d'épitope-rapporteur (Charbit, Boulain et al. 1986). Pratiquement, la séquence codante (CDS) d'un épitope est insérée dans la séquence du gène de l'OMP cible à un site défini. De là, deux observations sont réalisées. Si l'OMP produite a un caractère sauvage à la fois pour son insertion en membrane et pour sa fonction, l'insertion de la CDS de l'épitope est dite permissive. Deuxièmement, des anticorps spécifiques à l'épitope exprimé sont amenés et permettent de déterminer si la zone d'insertion est exposée vers le périplasme ou vers le milieu externe. Aucun résultat pour les sites testés pour la maltoporine n'a été contredit par la structure 3D cristallographique (Newton, Klebba et al. 1996). Cette technique d'insertion peut être complémenter avec une technique de délétion dirigée (Paquet 2000).

5.2 Prédictions topologiques d'Omp2a et Omp2b

Des prédictions topologiques d'Omp2a et Omp2b ont été réalisées par H. Mobasher (Mobasher, Ficht et al. 1997) et son équipe ainsi que par J.-Y. Paquet (Paquet, Vinals et al.

¹² Le caractère amphipathique d'un brin β transmembranaire est relatif au fait qu'un résidu de chaîne latérale hydrophobe est dirigé vers la membrane et est suivi par un résidu hydrophile dont la chaîne latérale se dirige vers la lumière du pore.

2000; Paquet, Diaz et al. 2001). Les méthodes utilisées par chacune des équipes sont très distinctes mais les résultats obtenus ne présentent que quelques différences.

H. Mobasher a utilisé une méthode spécifique aux porines consistant à calculer trois paramètres: l'hydrophobicité, le moment hydrophobe et la prédiction des *turns* (section reliant les brins β transmembranaires entre eux). Un segment dont le moment hydrophobe, calculé sur base des caractères hydrophobe et amphipathique du segment, est élevé sera prédit comme un brin β transmembranaire (Mobasher, Ficht et al. 1997).

J.-Y. Paquet a utilisé une méthode consensus, Cons4. Celle-ci combine deux types de méthodes prédictives. La première est une méthode de prédiction dite à "trois-états", à la base mise au point pour les protéines globulaires non membranaires. En effet, les modèles prédictifs spécifiques aux porines ne distinguent que deux états. Les trois états distingués sont "H" si le résidu est compris dans une hélice α^{13} , "E" si le résidu fait partie d'un brin β et "C" si le résidu ne correspond à aucun des deux états précédents. J.-Y. Paquet a testé 8 méthodes "trois-états" sur quatre porines test (dont les structures 3D sont connues) et en a ressorti les 3 meilleures alliant confiance prédictive et puissance. A ces méthodes "trois-états", J.-Y. Paquet a combiné un second type de prédiction topologique spécifique aux porines: la méthode de Schirmer (Schirmer and Cowan 1993). Cette méthode combine la présence d'une alternance entre résidu hydrophobe et résidu hydrophile et la présence de résidus aromatiques aux extrémités de ces segments pour prédire les brins β (Schirmer and Cowan 1993). La confiance de prédiction pour cette méthode est faible mais sa puissance est élevée et peu variable entre les porines test (Paquet 2000).

La prédiction topologique obtenue par J.-Y. Paquet pour Omp2a et Omp2b (Figure 8) montre une structure type tonneau β à 16 brins transmembranaires antiparallèles reliés entre eux par 8 boucles de 5 à 29 résidus de long. La boucle L3 est la plus longue. Les divergences de séquences les plus remarquables entre Omp2a et Omp2b de *Brucella* sont des insertions et/ou délétions en début des boucles L3 et L5 (Paquet, Diaz et al. 2001). Chez *B. abortus* (biovars 1, 2 et 4), l'Omp2a présente une délétion de 30 résidus touchant notamment la boucle L3. Or, lorsque *E. coli* exprime cette Omp2a, sa perméabilité est accrue par rapport à la souche exprimant Omp2b puisqu'elle est capable de croître sur maltose et sur maltotétraose, une molécule de 667 Da (Marquis and Ficht 1993). Étant donné que la boucle L3 joue un rôle important dans l'activité pore-formatrice de nombreuses porines (Jap and Walian 1996), l'hypothèse selon laquelle la plus grande quantité de charges négatives portées par la boucle L3 d'Omp2a comparativement à celle d'Omp2b serait à l'origine de différence de perméabilité (Paquet, Vinals et al. 2000), a été testée. Les résultats montrent que ça serait la boucle L5, et non la L3, qui se replierait sur l'entrée du tonneau de la porine (Paquet, Diaz et al. 2001). Notons toutefois que la perméabilité membranaire n'est pas uniquement dépendante des Omp2a et Omp2b et que d'autres OMPs pourrait l'influencer (Paquet, Diaz et al. 2001).

5.3 Cristallographie de protéines membranaires

Obtenir la structure 3D avec une haute résolution d'une protéine est crucial pour comprendre le mécanisme moléculaire sous-jacent à sa ou ses fonctions. De par leur exposition à la surface cellulaire, les protéines membranaires sont les cibles principales des médicaments et

¹³ Certaines porines comportent de courtes hélices α .

disposer de leurs structures peut aider à la conception rationnelle des substances médicamenteuses. La méthode la plus répandue permettant l'obtention de structure 3D à haute résolution de protéines est la cristallographie par diffraction aux rayons X. A leur actuelle¹⁴, la PDB (*Protein data bank*) répertorie quelques 43639 structures cristallographiques de protéines obtenues par diffraction aux rayons X. Parmi celles-ci, seules 178 protéines membranaires intégrales, correspondant à 412 entrées dans la banque de données, ont été cristallisées depuis 1985¹⁵. Or les protéines membranaires constituent 20 à 30% du génome des procaryotes, archées et eucaryotes code pour ces dernières (Hunte, Jagow et al. 2003). La cristallisation des protéines membranaires est rendue difficile à cause de leur caractère amphipathique. En effet, la surface de la protéine en contact avec la membrane est hydrophobe et sa solubilisation en milieu aqueux dénaturerait la protéine. Une des solutions à ce problème est l'utilisation de détergent lors de la solubilisation. Utilisés à une certaine concentration, ceux-ci se regroupent de manière sphérique et forment des micelles¹⁶. Ce niveau de concentration est dénommé "concentration micellaire critique" (CMC). Les protéines membranaires sont solubles dans une solution en détergent micellaire où elles forment des complexes, les queues hydrophobes remplacent l'environnement membranaire (Hunte, Jagow et al. 2003).

Plusieurs difficultés entravent le travail des expérimentateurs dont voici le détail ci-dessous (Hunte, Jagow et al. 2003).

5.3.1 Le matériel protéique

Un premier problème est lié à la quantité en protéine native pure nécessaire à la cristallisation qui est d'au moins 10 mg par essai. Bien que les OMPs soient en général présentes en grande quantité (Hunte, Jagow et al. 2003), leur surproduction en membrane est rendue difficile car elles ont souvent un effet toxique sur la bactérie (Cloeckaert, Verger et al. 1996; Paquet 2000). Il a donc fallu avoir recours à la surproduction en corps d'inclusion. Dans ce cas, les OMPs se retrouvent agrégées sous forme dénaturées et devront donc être renaturées après extraction. De telles expérimentations sur des OMPs ont déjà été réalisées avec succès (Pautsch, Vogt et al. 1999).

Un second problème est la purification de la protéine qui doit être homogène et pure à plus de 95%. L'hétérogénéité de la solution protéique peut notamment provenir de la protéolyse, de différents états d'oligomérisation ou encore de modifications post-traductionnelles. De plus, l'obtention de la protéine sous cette forme doit être reproductible. Tout comme les protéines solubles, les protéines membranaires peuvent prendre diverses conformations. Par conséquent, pour obtenir la structure cristallographique il faut tenir compte des changements conformationnels et des domaines mobiles (Hunte, Jagow et al. 2003).

¹⁴ Novembre 2008

¹⁵ Les chiffres concernant les protéines membranaires sont issus de la base de données *Membrane proteins of known structure*.

¹⁶ Les queues hydrophobes du détergent s'orientent vers l'intérieur et les têtes hydrophiles constituent la surface d'interaction avec le milieu aqueux environnant.

5.3.2 Les détergents

La clé du succès de la cristallisation de protéines membranaires est le choix du détergent (Hunte, Jagow et al. 2003) permettant le maintien de la protéine fonctionnelle et native sans qu'elle ne s'agrège ou ne précipite. Bien qu'étant des outils intéressants (comportement mimétique de la bicouche et leur capacité à s'assembler d'eux-mêmes), les détergents ont des comportements complexes en solution (Prive 2007).

La longueur de la chaîne alkyle des détergents semble jouer un rôle essentiel. Ainsi, de nombreuses protéines de membrane interne de bactéries et de mitochondries ainsi que des protéines membranaires d'eucaryotes ont été cristallisées avec l'octyl-glucoside (OG), l'un des détergents dont les chaînes alkyles sont les plus courtes (Hunte, Jagow et al. 2003). Ces dernières sont intéressantes car elles maintiennent la protéine soluble. Pour rappel, chaque détergent se caractérise par la valeur de sa CMC, concentration au-delà de laquelle des micelles se forment en milieu aqueux. Or au plus la chaîne alkyle est courte au plus la CMC est élevée (Prive 2007) et donc au plus il faudra de détergent. Elle augmente aussi lorsque le nombre de double liaison au sein des chaînes alkyles augmente. La CMC varie également en fonction du pH, de la force ionique, de la température, de la présence de protéine, de lipide et d'autres détergents. De plus, lorsque la concentration en contre ions augmente, la CMC des détergents ioniques diminue (Garavito and Ferguson-Miller 2001).

Cependant ce choix de détergent, l'OG, pour des protéines membranaires est loin d'être généralisable et d'autres détergents ont permis nombreuses réussites de cristallographies: *N,N*-dimethyldodecylamine-*N*-oxide (LDAO), octyltétraoxyéthylène (C_8E_4), *n*-decyl- β -D-maltopyranoside (DM) et *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM). La longueur de la queue hydrophobe n'est pas la seule caractéristique du détergent pouvant influencer la cristallisation, les têtes hydrophiles ont également leur importance. En effet, si des cristaux d'une protéine donnée sont obtenus avec divers détergents, la qualité de la diffraction de ces cristaux dépend du détergent (Hunte, Jagow et al. 2003). Il peut arriver que la protéine membranaire, en présence de détergent, précipite ou s'agrège. Ce phénomène s'explique par le fait que le détergent utilisé n'est pas en mesure de couvrir toute la surface hydrophobe de la protéine qui est par conséquent en contact avec le milieu aqueux. Une trop grande concentration en détergent peut aussi être à l'origine de l'agrégation de la protéine. La plupart du temps, une telle agrégation est irréversible (Prive 2007).

Les détergents se distinguent également par les charges qu'ils portent. Ils peuvent être cationiques, anioniques, neutres ou zwitterioniques. En général, les cristallisations réussies de protéines membranaires ont été réalisées avec des détergents neutres ou zwitterioniques (Hunte, Jagow et al. 2003). En effet, les détergents chargés tels que le SDS, un détergent anionique, sont souvent dénaturants. D'autres éléments de caractérisation des détergents sont le nombre d'agrégation, soit le nombre moyen de monomère (de détergent) par micelle, et le poids moléculaire de la micelle qui influencent la taille micellaire (Garavito and Ferguson-Miller 2001). La figure ci-contre (Figure 9) reprend les structures et caractéristiques citées ci-dessus pour quatre détergents utilisés au cours des renaturations de protéines: deux non ioniques et deux zwitterioniques.

En conclusion, la réussite d'essais de cristallogénèse dépend de nombreuses conditions: pureté, concentration, homogénéité de la protéine, choix du détergent, criblage de nombreuses conditions de cristallogénèse sur base de kits commerciaux dans un premier temps. Le choix

du détergent et des conditions de cristallogenèse sont empiriques, d'où la difficulté d'obtenir des cristaux exploitables pour les protéines membranaires.

Objectif et stratégies

L'objectif à long terme de ce travail est la caractérisation structurale de trois classes d'OMPs et ce, afin de mieux en comprendre leurs fonctions. Pour les Omp2a et Omp2b, par exemple, connaître leurs structures tridimensionnelles permettrait probablement de comprendre pourquoi l'expression d'Omp2a résulte en une plus grande perméabilité membranaire. Cette propriété est probablement en rapport avec le diamètre du pore d'Omp2a comparativement à celui de l'Omp2b, ce qu'une analyse structurale permettrait de documenter. Concernant les Omp25 et Omp31, encore peu de choses sont connues concernant leurs fonctions respectives. On a quelques indications quant aux effets de l'Omp25, qui n'est pas une porine, sur l'inhibition ou la répression de la production de TNF- α par des macrophages. Mais le mécanisme moléculaire de cette action de l'Omp25 n'est pas connu. Quant à l'Omp31, il a été montré qu'elle pourrait être impliquée dans l'export d'exopolysaccharide (EPS), un composant majeur des biofilms, et peut-être dans d'autres aspects de la production de l'EPS mais à nouveau, le ou les mécanisme(s) moléculaire(s) n'ont pas été élucidé(s). Aussi, il a été démontré que l'Omp31 est une HBP soit une *Haemin Binding Protein*, dont l'expression est induite lors d'une limitation en fer, condition que l'on retrouve en milieu intracellulaire. Encore une fois, connaître les structures de l'Omp25 et de l'Omp31 permettrait probablement la mise en place d'expérimentations qui éclaireraient les chercheurs sur leurs mécanismes d'action respectifs.

Le choix pour ces OMPs lors de ce travail s'est basé sur le fait qu'il s'agit des OMPs majeures de *Brucella* spp. Ces OMPs, du moins celles du groupe 3 (Omp25 et Omp31) pour *Brucella melitensis*, sont retrouvées au sein de la membrane des OMVs. Or, ces dernières joueraient un rôle important dans la virulence, notamment au niveau de l'interaction hôte/pathogène. Pourquoi travailler sur les Omp2a et Omp2b en parallèle? Tout simplement parce qu'il serait intéressant de comprendre le pourquoi de la différence de perméabilité membranaire au sucre lorsque l'une est exprimée par rapport à l'expression de l'autre. Aussi, ces OMPs du groupe 2 avaient déjà été surexprimés, renaturés et purifiés en petite quantité par J.-Y. Paquet lors de sa thèse (2000), constituant un protocole de première approche. Qui plus est, Géraldine Laloux, doctorante en URBM, a obtenu des données en levure qui suggèrent que l'Omp2b est un modulateur de l'apoptose mais pas Omp2a (résultats non publiés) ce qui constitue une autre différence fonctionnelle qui pourrait être liée une différence structurale.

Comme indiqué dans l'introduction, la cristallogénèse nécessite une grande quantité de protéines. Or la surexpression en membrane externe des Omp2a et Omp2b ainsi que de l'Omp25, s'est avérée toxique pour *E. coli*. C'est pourquoi la stratégie utilisée pour l'obtention des protéines a été la surexpression en corps d'inclusion chez *E. coli*. Les avantages de cette méthode sont l'obtention en grande quantité de la protéine d'intérêt et déjà d'une pureté relative. En effet, peu de protéines d'*E. coli* se retrouvent en corps d'inclusion et tout ce qui est surproduit y est aggrégé. Toutefois, cette technique a également un gros désavantage qui est l'obtention de la protéine d'intérêt dénaturée. Par conséquent, la mise au point d'une étape de renaturation sera nécessaire. Cette renaturation est effectuée à l'aide de détergents qui, par leurs propriétés physico-chimiques, miment la bicouche membranaire.

Pratiquement, les plasmides de surexpression pour les différents gènes des Omp25 et Omp31 doivent être construits. Les séquences codantes (CDS) sont obtenues par PCR sur de l'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M et *Brucella suis* 1330 sauvage. Ces CDS sont ensuite clonées dans un plasmide intermédiaire. Cette étape permet le séquençage des CDS et la

validation des constructions intermédiaires. Les CDS devront ensuite être transférées dans les vecteurs d'expression.

Parallèlement à ces manipulations, le travail de production, de purification et de renaturation est effectué sur les Omp2a et Omp2b. Pour ces deux OMPs, les plasmides de surexpression en corps d'inclusion sont déjà disponibles puisque construits par J.-Y. Paquet au cours de sa thèse (2000). Ils seront vérifiés par PCR et restriction diagnostique. L'objectif pour ces deux OMPs sera ensuite de mettre au point un protocole de purification, de renaturation et de concentration dans le but de réaliser des essais de cristallogenèse. Dans un premier temps, le protocole appliqué dans la thèse de J.-Y. Paquet sera utilisé. Ce protocole consiste à récupérer les OMPs à partir des corps d'inclusion, à les renaturer et à séparer la forme native, c'est-à-dire trimérique, des autres formes (monomères, dimères et agrégats) par chromatographie d'exclusion ou tamis moléculaire. Si ce protocole ne donne pas les résultats escomptés, un nouveau protocole sera mis au point. Les Omp2a et/ou Omp2b purifiées et renaturées seront ensuite utilisées pour de premiers tests de cristallogenèse.

Résultats et discussion

Dans le cas des Omp25 et Omp31 décrites précédemment, la construction de plasmides de surexpression en corps d'inclusions chez *Escherichia coli* a été entreprise. Les étapes de ce travail sont décrites ci-dessous et constitueront la première partie des résultats. La seconde partie concernera la surproduction, purification et renaturation des Omp2a et Omp2b pour lesquelles les plasmides de surproduction étaient déjà disponibles. Des essais de cristallogénèse ont également été envisagés dont l'objectif à long terme est l'obtention des structures tridimensionnelles des OMPs trimériques, des porines Omp2a et Omp2b.

1 Construction des plasmides de surexpression des Omp25 et Omp31

Différentes étapes de construction, représentées ci-contre (Figure 10), sont nécessaires à l'obtention d'un plasmide permettant la surproduction protéique. Une première étape consiste à insérer la CDS choisie au sein d'un plasmide qui pourra facilement être séquencé, le pGEM easy dans le cas présent. Le séquençage constitue la seconde étape. Les pGEM easy avec l'insert non muté (la CDS choisie) sont ensuite restreints de sorte à extraire la CDS qui sera alors liguée dans le plasmide de surexpression pET3a. Dans ce cas-ci, une restriction *ScaI* complémentaire a été réalisée sur le pGEM easy, le plasmide donneur pour l'insert. Cette restriction a pour effet de cliver dans la CDS de résistance à l'ampicilline évitant ainsi la sélection des clones contenant le pGEM easy avec insert en lieu et place de ceux contenant la construction pET3a avec insert, également porteur du gène de résistance à l'ampicilline.

1.1 Obtention des séquences codantes par PCR

Dans le but de surexprimer les Omp25 (BMEI1249, BMEI1007, BMEI1829 et BMEI1830) et les Omp31 (BMEI10844 et BR1622), il est nécessaire d'insérer leurs séquences codantes sous le contrôle d'un promoteur fort tel que le promoteur T7 issu du phage homonyme. Les séquences codantes de ces protéines seront obtenues en effectuant une PCR sur de l'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M et sur *Brucella suis* 1330 sauvage pour BR1622. Les amorces utilisées pour ces PCR (cfr Matériels et méthodes), ont été conçues de sorte à ôter le peptide signal prédit de chaque CDS étudiée (cfr Matériel et méthodes). Le retrait du peptide signal permettra dès lors de surproduire les OMPs en corps d'inclusion sous forme dénaturées et non en membrane externe comme décrit dans l'introduction. Ceci permet de limiter les problèmes dus à la toxicité de protéines porteuses d'un peptide signal. Ces amorces ont également pour particularité de permettre l'ajout de deux sites de restriction distincts, un en amont (*NdeI*) et un autre en aval (*BamHI*) de la CDS comme présenté sur le schéma (Figure 10).

Les produits PCR obtenus sont ensuite purifiés sur colonne (kit MSB[®] spin Rapace d'Invitex) et une fraction est déposée sur gel d'agarose.

Les tailles attendues des produits PCR sont de 584 bp, 656 bp, 636 bp, 638 bp, 677 bp et 716 bp respectivement pour les CDS suivantes: BMEI1249, BMEI1007, BMEI1829, BMEI1830, BMEI10844 et BR1622. Les profils de taille obtenus correspondent à ceux attendus (Figure

11). Dès lors, ces séquences pourront être introduites dans un premier plasmide : le pGEM easy.

1.2 Insertion des séquences codantes dans le pGEM easy et séquençage

Le plasmide pGEM-T easy est un vecteur commercial de Promega (cfr Matériels et méthodes). Celui qui sera utilisé pour les constructions en est une version modifiée. En effet, ce vecteur est originellement conçu pour faciliter la ligation avec un produit PCR obtenu avec la Taq polymérase. Or, cette dernière ajoute des adénines aux extrémités des produits PCR et le pGEM-T easy linéarisé présente, à cet effet, des thymines protrudantes. Cependant, dans le cas qui nous préoccupe, les PCR ont été réalisées par la *Phusion* High-Fidelity DNA polymérase qui n'introduit pas d'adénine supplémentaire et forme donc des produits PCR à extrémités franches. Afin d'optimiser la ligation au plasmide pGEM-T easy, les thymines concernées ne sont pas présentes, d'où la nouvelle dénomination du plasmide pGEM-T easy en pGEM easy. Ce dernier plasmide était préalablement disponible au laboratoire. Cette modification du plasmide pGEM-T easy crée un site de restriction *EcoRV*, bordé de part et d'autre par des sites *EcoRI*, qui permet l'obtention du pGEM easy linéarisé à bouts francs.

La ligation entre la CDS, obtenue par PCR, et le pGEM easy ne permet pas de connaître le sens dans lequel la CDS s'insérera étant donné que cette ligation est franche. Cependant, l'orientation de la CDS n'interfère en rien dans la poursuite des constructions.

Le produit de la ligation entre le pGEM easy et le produit PCR de chacune des OMPs est alors transformé par choc thermique dans *E. coli* de souche DH10B CaCl_2 compétentes afin d'obtenir les plasmides d'intérêt en plus grande quantité. Pour chaque ligation, quatre clones sont mis en culture afin de réaliser une purification d'ADN plasmidique (miniprep) suivie d'une restriction diagnostique. Les enzymes de restriction ont été choisies de sorte à ressortir l'insert du plasmide. Ainsi, l'ensemble des constructions ont été restreintes par l'enzyme *EcoRI* clivant de part et d'autre du site d'insertion *EcoRV*. Cependant, au sein même de la CDS de BMEI1830 existe déjà un site de restriction pour *EcoRI*. C'est pourquoi les enzymes *BamHI* et *NdeI* ont été utilisés dans ce cas particulier. Les produits des restrictions obtenus pour les diverses OMPs sont déposés sur un gel d'agarose (Figure 12 et Figure 13). Les profils obtenus sont tous corrects à l'exception du clone 4 de la ligation pGEM easy et BMEI1007 dont le profil ne correspond ni à la ligation attendue ni au pGEM easy seul.

Avant de poursuivre les constructions, il est important de séquencer les inserts afin de vérifier qu'il n'y ait pas de mutation. Les profils des restrictions diagnostiques ont permis la sélection de clones à séquencer: les clones 3 et 4 pour BMEI1249, les clones 2 et 3 pour BMEI1007, le clone 4 pour BMEI1829, le clone 3 pour BMEI1830, le clone 4 pour BMEI10844 et enfin les clones 3 et 4 pour BR1622. Les séquences obtenues ont été alignées à la séquence théorique du produit PCR correspondant. Cet alignement a été réalisé à l'aide du logiciel ApE (version 1.12), un éditeur de plasmide. L'analyse des différents alignements de séquences montre qu'il n'y a aucune mutation parmi les clones séquencés sauf pour l'un d'entre eux, le clone 3 de BMEI1007. Ce dernier comprend en effet la mutation suivante au site de restriction de *NdeI*: CAT[^]ATG est muté en CAATATG. Par conséquent, le clone 2 pour BMEI1007, ne présentant pas cette mutation, a été utilisé pour la suite.

Plusieurs essais de ligation ont été réalisés entre les CDS extraites des pGEM easy et le pET3a linéarisé. Cependant, les PCR sur colonies et les restrictions diagnostiques sur ADN plasmidique de nombreux clones n'ont pas permis de mettre en évidence des clones positifs,

autrement dit, des clones contenant le plasmide pET3a et son insert. Une autre stratégie devra être mise en place afin de terminer ces constructions. Classiquement, lorsque ces plasmides de surexpression auront été construits, il suffira de les transformer en *E. coli* BL21(DE3)pLysS, une souche de surproduction, et de tester qu'il y a bien surexpression par induction à l'IPTG. Cette méthodologie a été appliquée aux plasmides de surexpression d'*omp2a* et *omp2b* au point 3.1.

2 Vérification des plasmides de surexpression d'*omp2a* et d'*omp2b* issus de la thèse de J.-Y. Paquet

Au cours de sa thèse (2001), Jean-Yves Paquet a été amené à construire les plasmides de surproduction des Omp2a et Omp2b, regroupés sous la terminologie d'Omp36. Cette même thèse indique que les inserts *omp2a* et *omp2b* ont déjà été séquencés et qu'ils se trouvent dans le plasmide de surproduction pET3a. Les plasmides sont respectivement nommés pET2a et pET2b pour les pET3a comprenant les CDS d'Omp2a et Omp2b. Afin de vérifier que ceux-ci correspondaient bien à ces constructions, deux techniques de vérification de plasmides ont été appliquées: la PCR et la restriction diagnostique.

2.1 Vérification par PCR

Les amorces utilisées au cours de cette expérience sont également celles utilisées au cours de la thèse de J.-Y. Paquet. Comme présenté dans la partie "Matériels et méthodes", il n'y a que trois amorces distinctes pour l'amplification des CDS *omp2a* et *omp2b*. En effet, l'amorce amont, 2aF, est commune aux deux CDS.

Quatre PCR distinctes ont été effectuées sur pET2a et pET2b; une PCR classique avec les bonnes amorces, une seconde PCR dont l'amorce aval correspond à l'autre CDS¹⁷ (utilisation de l'amorce 2aR pour *omp2b* par exemple) et les deux dernières PCR sont des contrôles négatifs, c'est-à-dire sans plasmide, une fois avec l'amorce aval 2aR et une fois avec l'amorce aval 2bR. La photo du gel d'agarose (Figure 14) sur lequel ont migrés les différents produits PCR montre un résultat attendu. Ainsi, seules les PCR avec plasmide, pET2a ou pET2b, et l'amorce aval correspondante présentent une bande d'acides nucléiques de taille attendue: 1148 bp pour pET2a et 1132 bp pour pET2b.

2.2 Vérification par restriction diagnostique

Bien que la PCR diagnostique semble indiquer que les plasmides correspondent à ceux attendus, une seconde vérification a été réalisée. Les produits PCR obtenus à l'étape précédente sont préalablement purifiés sur colonne (MSB[®] spin Rapace d'Invitex) et quatre restrictions diagnostiques ont été ensuite réalisées en parallèle pour chacun des deux produits PCR. Pour la CDS *omp2a*, les tailles attendues sont: 719 bp, 227 bp et 202 bp pour la restriction par *EcoRI*; 424 bp, 256 bp, 252 bp, 190 bp et 14 bp pour la restriction par *HinfI*; deux bandes à 375 bp, une à 281 bp et une dernière à 117 bp pour la restriction par *PstI*; 976

¹⁷ Ce contrôle permet de s'assurer que pET2a comprend bien la CDS d'*omp2a* et non celle d'*omp2b* et inversement pour le plasmide pET2b.

bp et 172 bp pour la restriction par *RsaI*. Parallèlement, les tailles attendues pour la CDS *omp2b* sont: 733 bp et 399 bp pour la restriction par *EcoRI*; 465 bp, 394 bp et 267 bp pour la restriction par *HinfI*; 852 bp et 280 bp pour la restriction par *PstI*; et, 647 bp, 313 bp et 172 bp pour la restriction par *RsaI*. Les produits de ces restrictions sont visualisés après migration sur gel d'agarose (Figure 15). Chacune des restrictions montre un profil similaire à celui attendu. Dès lors, les plasmides pET2a et pET2b peuvent être utilisés pour surproduire les Omp2a et Omp2b, respectivement.

3 Production, purification, renaturation et cristallogenèse d'Omp2a et d'Omp2b

Cette dernière partie "Résultats" du mémoire concerne uniquement le travail de recherche effectué sur les Omp2a et Omp2b, OMPs pour lesquelles les plasmides de surexpression ont été vérifiés dans la seconde partie des "Résultats". Ce dernier point est subdivisé en différents sous-points. Le premier concerne l'application de protocoles mis au point lors de la thèse de J.-Y. Paquet et plus précisément, les étapes de surproduction d'OMPs en corps d'inclusion, la renaturation et la purification par chromatographie d'exclusion ou tamis moléculaire de ces OMPs. Pour diverses raisons qui sont décrites plus loin, ces protocoles ont été en partie modifiés ce qui amène au deuxième et au troisième sous-points. Enfin, les deux derniers sous-points concernent la cristallogenèse et l'étape essentielle de concentration des OMPs préalable aux essais de cristallogenèse.

3.1 Surproduction en corps d'inclusion, renaturation et purification par tamis moléculaire: protocole issu de la thèse de J.-Y. Paquet

La surproduction en corps d'inclusion des Omp2a et Omp2b a été réalisée après transformation des pET2a et pET2b dans BL21(DE3)pLysS, une souche d'*E. coli* (cfr Matériels et méthodes). Cette souche possède le plasmide pLysS empêchant la production à un niveau basal de la protéine d'intérêt. La production de porines par cette souche est induite via l'ajout d'IPTG au milieu de culture lorsque les bactéries atteignent la phase de croissance exponentielle. Une fois le temps d'induction écoulé, les corps d'inclusion sont récupérés par centrifugation, lavés et solubilisés par un agent chaotrope, par exemple 8M d'urée dissouts dans le tampon TEN ou tampon de lyse. Pour chacune des OMPs, la fraction soluble, les surnageants des deux lavages des corps d'inclusion et une fraction des corps d'inclusion solubilisés ont été déposés sur gel SDS-PAGE (Figure 16). Il apparaît clairement que ces deux protéines ont été surproduites et que la majeure partie de celles-ci est retrouvée dans la dernière fraction, celle des corps d'inclusion solubilisés.

Une fois obtenues, ces porines dénaturées en solution ont été renaturées en les diluant à du détergent dissout dans du tampon TEN, tout en vortexant, dans un rapport 1:1. Cette dilution rapide sous agitation empêche l'agrégation des protéines. Au cours de sa thèse, J.-Y. Paquet a utilisé du zwittergent 3-14, un détergent zwitterionique, à une concentration 10%. Classiquement, la concentration en détergent utilisée pour des renaturations de protéines est, au final, égale à 10 fois la concentration micellaire critique (CMC). Or, la CMC du zwittergent 3-14 est de ~0,2 mM soit 0,007% (en solution 10 mM phosphate à pH 7,5). Dès lors, les Omp2a et Omp2b ont également été renaturées par dilution 1:1 dans du zwittergent 3-14 à une concentration de 0,14% donnant une concentration finale de 0,07%. Une concentration intermédiaire de zwittergent 3-14 de 1% a également été testée.

Les Omp2a et Omp2b¹⁸ renaturées sont déposées sur gel SDS-PAGE afin de permettre la visualisation des trimères éventuellement formés qui, pour rappel, sont un indicateur de la

¹⁸ Les poids moléculaires monomériques calculés sur base des séquences nucléotidiques sont de 39,4 kDa et de 40,3 kDa pour Omp2a et Omp2b respectivement.

renaturation d'Omp2a et Omp2b (Figure 17). L'interprétation de ces gels d'électrophorèse est délicate. Concernant la renaturation avec le zwittergent 3-14 de concentration 10%, à la fois pour Omp2a et Omp2b, apparaît une bande de taille d'environ 100 kDa. Ces bandes pourraient correspondre à du dimère, à condition que cette forme soit stable pour ces OMPs, ou à du trimère d'OMPs si la migration est altérée par la structure 3D ou par la présence de zwittergent 3-14 expliquant la taille apparente de ces protéines. Le bas du gel présente un défaut de migration dans les puits où ont été déposées les OMPs renaturées. Ce défaut de migration pourrait être dû à la concentration élevée en détergent. Le second gel de cette figure est le résultat de l'utilisation d'une concentration intermédiaire en zwittergent 3-14 (1%) pour la renaturation d'Omp2a (non testé sur Omp2b). La migration d'Omp2a après renaturation permet la visualisation, dans le puits 4, d'une bande plus marquée de taille d'environ 120 kDa ce qui correspondrait à la forme trimérique de la porine. Ce gel permet également de mettre en évidence l'intérêt de l'étape de sonication appliquée dans toutes les expérimentations de renaturation. Cette étape permet d'éviter un effet d'agrégation du détergent réduisant l'efficacité de la renaturation. En effet, sans cette étape, aucune bande n'apparaît à 120 kDa contrairement à ce qui est observé dans le cas contraire. Pour clôturer les commentaires relatifs à cette figure, le gel C présente le profil de migration de la renaturation des Omp2a et Omp2b avec du zwittergent 3-14 de concentration 0,14%. Pour rappel, cette concentration initiale en détergent donne au final une concentration égale à dix fois la CMC. Les deux bandes encadrées sur la figure du gel C ont un poids apparent bien supérieur à celui attendu de 120 kDa. Elles semblent plutôt correspondre à de la protéine n'ayant pas migré ou à de la protéine agrégée. Par conséquent, ce sont les échantillons d'OMPs renaturées avec 1% de zwittergent 3-14 qui ont été purifiés par chromatographie d'exclusion.

La purification par chromatographie d'exclusion ou tamis moléculaire a pour but de séparer les porines renaturées sous forme trimérique de celles renaturées sous forme dimérique et monomérique. Pour rappel, l'objectif à long terme est d'obtenir la structure 3D des porines Omp2a et Omp2b sous leur forme active qu'est le trimère. Préalablement à la purification, les porines ont été concentrées à l'aide d'Amicon Ultra (cut-off de 10 000 Da) et filtrées (filtre de 0,22 µm). Afin d'optimiser la résolution de la purification, la quantité maximale en protéines déposée sur la colonne Superdex 200 est de 20 mg. Une fois l'échantillon chargé, l'élution a été réalisée avec le même tampon que celui de l'échantillon. Selon la thèse de J.-Y. Paquet, le premier pic visible correspondrait à un agrégat de protéines, le second serait le pic de trimères de porines et le dernier pic correspondrait à des protéines en faible quantité de la taille attendu pour le monomère. Le chromatogramme obtenu pour Omp2a (Figure 18) semble correspondre à ce qui est décrit dans la thèse. Un certain nombre des fractions récoltées est choisi afin d'être déposées sur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent (Figure 19). On observe que le premier pic pourrait correspondre à des protéines de taille attendue pour du monomère d'Omp2a et que le second pourrait correspondre à un mélange de trimères et de monomères pour cette OMP. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de J.-Y. Paquet. Par ailleurs, la chromatographie d'exclusion se base sur un principe de purification en fonction de la taille des protéines permettant d'éluer en premier lieu les protéines les plus imposantes et en dernier lieu les protéines de poids moléculaires les plus faibles. Le contraire est observé dans ce cas-ci. Un tel résultat est difficilement interprétable. C'est pourquoi nous avons dû élaborer un nouveau protocole de purification.

Dans ce cadre, des recherches bibliographiques ont été réalisées afin de mettre en évidence d'autres méthodes de purification et de renaturation de protéines membranaires. De nombreux articles présentent des protocoles de purification par chromatographie échangeuse d'ions pour

des protéines produites en corps d'inclusions (Taylor, Burgner et al. 1998; Zhang, Blanco et al. 1999; Bolla, Saint et al. 2004; Kumar and Krishnaswamy 2005; Kuo, Chin et al. 2008).

3.2 Nouveau protocole de purification: chromatographie échangeuse d'ions

La mise en place de ce nouveau protocole reprend en partie celui précédemment utilisé jusqu'à l'étape de solubilisation, par le tampon TEN additionné de 8M urée, des corps d'inclusion contenant les OMPs surproduites. Une fois la vérification de surproduction effectuée par SDS-PAGE (résultat similaire à celui représenté à la Figure 16), une toute autre démarche est entreprise.

En effet, afin d'optimiser l'étape de renaturation, nous avons envisagé de purifier les protéines sous forme de corps d'inclusion solubilisés avant de les renaturer. Les points isoélectriques calculés des Omp2a et Omp2b sont respectivement de 4,27 et 4,42. Ces valeurs ont été déterminées sur base de la séquence en acides aminés de ces OMPs sur le site "<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>". Ces valeurs de point isoélectrique justifient le choix d'une chromatographie échangeuse d'anions telle que réalisable sur une colonne de cellulose DEAE (diethylaminoethyl). En effet, à pH=8,0, Omp2a et Omp2b sont chargées négativement. La purification des corps d'inclusion solubilisés, filtrés à 0,22 µm, est réalisée sur la colonne équilibrée avec le tampon A (50 mM Tris-HCl, 17 mM NaCl, 8 M Urée, pH=8,0). Une fois les protéines contaminantes éliminées dans le flow through, les OMPs sont éluées par un gradient de NaCl, allant de la concentration initiale de 17 mM NaCl (tampon A) à une concentration de 500 mM NaCl (tampon B). La forte concentration en sel a pour effet de réduire le degré d'ionisation de la colonne et de la protéine purifiée ce qui résulte en une capacité de liaison réduite entre la résine et l'OMP. La mesure d'absorbance à 280 nm à la sortie de la colonne indique une forte quantité en protéines éluées lors du gradient en NaCl (Figure 20). Dans ce cas-ci, les corps d'inclusion solubilisés sont issus d'une culture de surproduction d'Omp2a de 200 ml.

Une partie des fractions obtenues a été choisie pour être déposée sur gel SDS-PAGE (Figure 21). La pureté des fractions obtenues après DEAE, comparativement à l'échantillon d'Omp2a non purifié du gel A (Figure 21), est accrue et approxime les 80%-90%. Les fractions purifiées 19 à 20', soit un volume de 25 ml, contenant de l'Omp2a sont regroupés. Remarquons que le flow through contient également de l'Omp2a. Ce résultat s'expliquerait notamment par une saturation de la colonne en Omp2a. Si l'on voulait augmenter le rendement de la purification et récupérer ces Omp2a, le flow through pourrait être purifié une seconde fois par échangeuse d'anions. Toutefois, améliorer le rendement de purification des OMPs n'est pas une priorité de ce travail et la quantité en protéines est suffisante (cfr point 3.4) pour envisager les étapes de renaturation et de cristallogénèse.

3.3 Mise au point d'un nouveau protocole de renaturation des Omp2a et Omp2b

3.3.1 Choix du détergent et mise au point de la concentration en urée et en OMPs

Pour la suite, une concentration finale en détergent égale à dix fois la CMC a été utilisée et non plus des concentrations telles que 5% et 0,5%, soit des concentrations initiales de 10% et 1%, de zwittergent 3-14 utilisées au point 3.1. Ce choix de concentration en détergent permet la comparaison entre les divers détergents testés. Le type de détergent et sa concentration ne

sont pas les seuls facteurs influençant le processus de renaturation. Ainsi, la concentration en OMP, en urée ou encore en NaCl interagissent également. C'est pourquoi, diverses conditions de renaturation ont été étudiées.

De nombreux détergents existent et peuvent être classifiés selon leurs charges en tant que détergent non ionique, anionique, cationique ou zwitterionique. Leurs caractéristiques et utilisations ont été décrites dans l'introduction.

Des essais de renaturation ont été effectués sur huit détergents différents dont le zwittergent 3-14 précédemment utilisé (Table 1). Chacun des détergents a été préparé de sorte à en avoir une concentration égale à 10 fois leur CMC respective après renaturation.

Table 1. Détergents utilisés pour les essais de renaturation. La première colonne de numérotation romaine correspond à la numérotation reprise dans les figures de renaturation (Figure 22). Les références catalogues sont celles de l'entreprise Anatrace. Pour le type de détergent, les sigles utilisés correspondent à: +, chargé positivement; -, chargé négativement; Z, zwitterionique et N, neutre. PM signifie poids moléculaire en gramme par mole.

	Détergent	Référence catalogue	Type	PM	CMC (mM)	Tampon de référence pour la CMC
I	<i>n</i> -octyl- β -D-glucopyranoside	O311	N	292,4	23,4	0,1M NaCl
II	<i>n</i> -dodecyl- β -D-maltopyranoside	D310A	N	510,6	0,12	0,2 M NaCl
III	<i>n</i> -decyl- β -D-maltopyranoside	D322	N	482,6	1,8	0,15 M NaCl
IV	<i>n</i> -dodecyl- <i>N,N</i> -diméthylamine- <i>N</i> -oxide	D360	Z	229,4	0,14	0,1 M NaCl
V	ANAPOE-C ₁₂ -E ₉	APO129	N	583	0,05	H ₂ O
VI	CHAPS	C316	Z	614	8	H ₂ O
VII	Anzergent 3-14*	AZ314	Z	363,6	0,2	10mM Phosphate, pH 7,5
VIII	Deoxycholic acid, sodium salt	D380	-	414,6	6	H ₂ O

* L'anzergent 3-14 est chimiquement la même molécule que le Zwittergent 3-14

Parallèlement au criblage des détergents, différentes concentrations finales en urée et en OMPs ont été testées. En effet, après purification, la concentration en urée est toujours de 8M, concentration permettant de maintenir l'OMP solubilisée. Une renaturation directe de l'OMP avec le détergent (dissout dans le tampon C: 50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl et pH=8,0) qui se fait, pour rappel, dans un rapport de volume 1:1, ne réduirait la concentration en urée qu'à 4M. Afin de faire varier cette concentration en urée, les Omp2a et Omp2b sont diluées dans différentes proportions dans du tampon avec 8M urée (mélange 1:1 des tampons A et B) ou sans urée (tampon C). Les Omp2a et Omp2b issues de la purification ont donc dû être concentrées avant de lancer les essais de renaturation. Cette concentration a été réalisée grâce à l'utilisation d'amicons (cut-off de 10 000 Da). Les concentrations obtenues, par mesure de l'absorbance à 280 nm, sont de 1,9 mg/ml et de 1,1 mg/ml pour les lots purs à 95% d'Omp2a et d'Omp2b respectivement¹⁹. La concentration en protéine intervient également dans l'efficacité de la renaturation. En effet, la disponibilité en molécules de détergent par molécule

¹⁹ Les coefficients d'extinction (ϵ) calculés sur base des séquences nucléotidiques d'Omp2a et Omp2b sont de 2,158/mg/ml et de 2,279/mg/ml respectivement.

d'OMP à renaturer varie en fonction de cette concentration en OMP (à concentration égale en détergent).

Ces conditions, testées pour les huit détergents (Table 1), ont été résumées ci-dessous (Table 2).

Table 2. Résumé des trois conditions de concentration en urée et en OMPs testées par détergent pour Omp2a et Omp2b. Les numéros de condition correspondent à ceux repris sur les gels SDS-PAGE (Figure 22). Le tampon avec 8M urée est un mélange de rapport 1:1 des tampons A⁽¹⁾ et B⁽²⁾. Lorsqu'il est question d'une dilution (colonne 2 et 3), il s'agit toujours d'une dilution ayant pour rapport volumique 1:1.

N° de la condition	Dilution avec le tampon urée 8M	Dilution avec le tampon C ⁽³⁾ (sans urée)	[Urée] _{finale}	[Omp2a] _{finale} (mg/ml)	[Omp2b] _{finale} (mg/ml)
1	0	0	4M	~ 0,949	~ 0,531
2	1	0	4M	~ 0,475	~ 0,266
3	0	1	2M	~ 0,475	~ 0,266

⁽¹⁾ Tampon A: 50 mM Tris-HCl, 17 mM NaCl, 8 M Urée, pH=8,0

⁽²⁾ Tampon B: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 8 M Urée, pH=8,0

⁽³⁾ Tampon C: 50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl et pH=8,0

Suite à l'étape de renaturation et de sonication, les échantillons renaturés d'Omp2a et Omp2b ont été déposés sur gel SDS-PAGE (Figure 22). L'interprétation de ces gels met en avant l'hypothèse que le détergent II, soit le n-docecyl-β-D-maltopyranoside, semble le plus efficace pour la renaturation des Omp2a et Omp2b. Seul ce détergent laisse apparaître des bandes de taille d'environ 100 kDa qui correspondraient à la forme trimérique des Omp2a et Omp2b. Bien que pour Omp2a la condition 2 montre la présence d'une bande d'environ 100 kDa, une bande de même taille est plus marquée pour la condition 3. Pour Omp2b, seul la condition 3 semble permettre la formation de trimères. De plus, une bande supplémentaire de taille intermédiaire aux formes monomérique et trimérique est mise en évidence par coloration au nitrate d'argent. L'hypothèse proposée est que cette bande est constituée d'intermédiaires dimériques d'Omp2b dont la présence s'expliquerait par l'existence d'un équilibre entre les trimères et monomères de porines. Quoiqu'il en soit, la condition 3 amène à une renaturation contrairement aux deux autres conditions testées, indiquant que la réduction de la concentration en urée à 2M n'est pas anodine.

En ce qui concerne la concentration en protéines à renaturer, l'utilisation de concentrations différentes en Omp2a par rapport à celle de l'Omp2b permet de dire que dans une fourchette de concentration finale allant d'environ 0,25 mg/ml à 0,5 mg/ml, la renaturation est effective. La concentration en OMPs pour la renaturation a également été testée dans un autre contexte au point 3.4.

3.3.2 Mise au point de la concentration en NaCl et en urée

Pour les essais de renaturation du point précédent, la concentration en NaCl a été, dans la mesure du possible, maintenue à un taux similaire à la concentration atteinte après purification échangeuse d'anions. Cette concentration a été estimée à 250 mM NaCl. Or, la présence de NaCl doit également influencer sur l'efficacité de la renaturation en interagissant avec les charges des OMPs lors du repliement de monomères et de leur interaction aboutissant à la forme trimérique. Afin de tester la renaturation en présence d'une plus petite concentration en NaCl, chaque OMP surproduite et purifiée a été dialysée dans un tampon de

dialyse à faible teneur en NaCl (50 mM NaCl, 50 mM Tris, 8M urée et de pH=8,0). Comme pour les essais précédents, ces OMPs ont été concentrées grâce aux amicons (cut-off 10 000 Da). Puisque précédemment, c'est la concentration la plus faible en urée (2M) qui a été la plus efficace à la renaturation, les lots d'Omp2a et Omp2b ont été aussi testés à des concentrations plus réduites encore en urée. Au final, trois conditions ont été testées, à nouveau sur les huit détergents (Table 1) et sur les deux OMPs.

Table 3. Résumé des trois conditions de concentration en urée testées par détergent pour Omp2a et Omp2b dans un environnement faible en NaCl. Les numéros de condition correspondent à ceux repris sur les gels SDS-PAGE (Figure 23). Les dilutions, quelqu'en soit le nombre (0 à 3), sont des dilutions dont le rapport volumique entre la solution à diluer et le tampon de dilution est de 1:1. Les tampons de dilution sont le tampon A (50mM Tris, 17mM NaCl, 8M urée et pH=8,0) et le tampon D (50mM Tris, 50mM NaCl et pH=8,0) qui ne contient pas d'urée.

N° de la condition	Dilution avec le tampon A (urée 8M)	Dilution avec le tampon D (sans urée)	[Urée] _{finale}	[Omp2a] ou [Omp2b] _{finale} (mg/ml)
4	2	1	2M	0,25
5	1	2	1M	0,25
6	0	3	0,5M	0,25

A la suite de l'étape de sonication, une fraction des essais de renaturation est déposée sur gel SDS-PAGE (Figure 23).

Aucun des gels SDS-PAGE (Figure 23) ne présente de bande pouvant être assimilée à de l'OMP trimérique. Pour plusieurs gels, la renaturation avec les détergents I à III laisse apparaître des bandes de tailles inférieures à celle des 37 kDa ce qui pourrait être une indication de la dégradation de l'OMP.

Notons qu'une concentration intermédiaire en sel, 150 mM NaCl, a également été testée sur Omp2a sans donner plus de résultat.

En conclusion, la condition de renaturation la plus efficace est celle pour laquelle la concentration en urée est de 2M, la concentration en OMP est située entre 0,25 et 0,5 mg/ml et la concentration en NaCl n'est pas modifiée après purification et tourne dès lors autour des 250 mM.

3.4 Concentration de l'Omp2a en vue des essais de cristallogenèse

Généralement, l'obtention de cristaux de protéines nécessite d'avoir une solution pure, à plus de 90%, et fortement concentrée. L'étape de purification par chromatographie échangeuse d'anions a permis d'obtenir une pureté suffisante. Une fois les conditions de renaturation d'Omp2a et Omp2b établies, il a fallu trouver un moyen de concentrer ces OMPs sous leur forme native. Dans la littérature, les protéines membranaires cristallisées sont concentrées à 15 mg/ml (Ho, Pomroy et al. 2008), à 20 mg/ml (Bolla, Saint et al. 2004) ou encore à 25 mg/ml (Basle, Rummel et al. 2006; Kuo, Chin et al. 2008).

Pour les premiers essais de cristallogenèse, nous nous sommes concentrés sur l'Omp2a car elle a précédemment donné de meilleurs résultats de renaturation que l'Omp2b (Figure 22, condition 3). Dans un premier temps, deux stratégies ont été testées en parallèle sur Omp2a. Cette dernière a été soit concentrée puis renaturée soit renaturée puis concentrée. Concentrer Omp2a a été réalisé à nouveau à l'aide d'Amicons-Ultra de cut-off de 10 000 Da. Dans le

premier cas où Omp2a est concentrée puis renaturée, la concentration obtenue a été de 25,0 mg/ml (par mesure d'absorbance à 280 nm). Dans le second cas où la renaturation précède la concentration d'Omp2a, la concentration obtenue en Omp2a a été de 22,6 mg/ml (mesure par absorbance à 280 nm). Ces deux lots d'Omp2a renaturées et concentrées ont ensuite été déposées sur gel SDS-PAGE (Figure 24).

Clairement, la première méthode ne fonctionne pas. En effet, le puits 2 présente surtout une bande à 37 kDa mais rien de comparable n'est observé à une taille relative de 120 kDa. Ceci s'explique par le fait qu'à une même concentration en détergent, est ajouté une quantité beaucoup plus importante de protéines (Omp2a concentrée à 25,0 mg/ml). Par conséquent, il y a trop peu de détergent pour empêcher Omp2a de s'agréger et pour permettre la renaturation correcte de celle-ci. Quant à la seconde méthode, pour laquelle Omp2a a été renaturée puis concentrée, celle-ci paraît efficace bien qu'une partie des Omp2a soit restée sous forme monomérique (puits 5). La présence de forme monomérique et trimérique peut s'expliquer par le fait qu'il existe un équilibre entre Omp2a native en monomère et en trimère. Remarquons également que dans le puits 4, deux bandes autour des 37 kDa sont apparues. Une hypothèse serait que la forme monomérique native d'Omp2a puisse présenter deux conformations (ou plus) migrant différemment sur gel SDS-PAGE.

3.5 Essais de cristallogenèse sur Omp2a

Comme précisé précédemment, l'obtention de cristaux de protéines, et plus particulièrement de protéines membranaires, n'est pas chose aisée. C'est pourquoi, il existe des kits commerciaux permettant de réaliser des criblages de 48 conditions par kit. Les conditions choisies par les firmes le sont sur base de réussites cristallographiques (obtention de cristaux et de structure 3D à haute résolution) décrites dans la littérature. De nombreux kits existent selon les macromolécules visées. Le kit utilisé pour Omp2a est le kit "MembFac" de "Hampton Research" (Figure 25). Ce kit a été conçu pour les macromolécules biologiques et plus particulièrement pour les protéines membranaires. Les paramètres variables dans ce kit sont le pH, le tampon, le type de sel et l'agent précipitant. La technique de cristallogenèse utilisée est celle de la goutte suspendue (cfr Matériels et méthodes) qui est la plus fréquemment utilisée. C'est par un phénomène de diffusion et d'osmose que les cristaux se forment peu à peu. La table ci-après reprend les observations qui ont été faites sur les gouttes d'essais de cristallogenèse sur Omp2a pour chaque condition testée. La précipitation est visible directement, la goutte devenant alors trouble.

Table 4. Table des observations des essais de cristallogenèse sur Omp2a avec le kit "MembFac" (Hampton Research). Chaque cellule de la table est relative à une condition testée. La numérotation de ces cases correspond à la numérotation des conditions du kit MembFac (Figure 25). "C" signifie que la goutte est claire, qu'Omp2a est restée soluble. "P" signifie que la goutte est trouble, qu'Omp2a a précipité.

1 C	2 P	3 P	4 C	5 P	6 C
7 C	8 C	9 C	10 P	11 P	12 C
13 P	14 C	15 C	16 C	17 P	18 P
19 P	20 C	21 C	22 C	23 P	24 C
25 P	26 C	27 C	28 C	29 C	30 P
31 C	32 C	33 C	34 P	35 C	36 C
37 C	38 C	39 C	40 C	41 C	42 C
43 C	44 P	45 C	46 C	47 C	48 C

Dans certaines conditions, Omp2a précipite dès le lancement de l'essai. De telles observations sont tout à fait normales puisque le principe de la cristallogenèse est de trouver la (ou les) condition(s) où un équilibre se crée entre la phase soluble et la phase de précipitation de la protéine. Un moyen de savoir si la protéine testée est à bonne concentration est d'observer la proportion de gouttes précipitées par rapport à celles restées claires. Dans ce cas-ci, seules 14 gouttes sur les 48 ont précipitées indiquant qu'Omp2a n'est peut-être pas suffisamment concentrée. Par conséquent, une perspective serait de relancer des essais de cristallogenèse avec une Omp2a plus concentrée.

Conclusions et perspectives

1 **Protéines de la membrane externe du groupe 3: Omp25 et Omp31**

L'objectif pour ces OMPs était de construire les plasmides qui auraient permis leur surexpression. Celui-ci n'a pu être atteint en raison des difficultés à cloner les CDS de ces OMPs dans le vecteur de surexpression pET3a. Deux hypothèses peuvent être posées pour expliquer ce problème. La première est qu'au cours des différents essais de ligation des CDS dans le plasmide pET3a, la ligation n'a pas fonctionné. En effet, pour réaliser cette ligation, les CDS ont été sortis du vecteur pGEM easy par restriction par *NdeI* et *BamHI*. Cette étape a été vérifiée sur gel d'agarose. Il a également fallu restreindre avec les mêmes deux enzymes le plasmide pET3a. Vérifier que la restriction par les deux enzymes a été effective sur un même lot de pET3a n'est pas possible étant donné la distance très faible séparant les deux sites de restriction sur ce plasmide. Ceci est peut-être une cause du problème rencontré pour la ligation. La seconde hypothèse de l'échec de ces constructions est liée à la difficulté de sélection des clones comportant le plasmide pET3a ligué à une CDS donnée. En effet, les plasmides pGEM easy et pET3a sont tous deux porteurs du gène de résistance à l'ampicilline. Afin de résoudre ce problème, une troisième restriction par *ScaI*, ayant un site unique dans le gène codant pour la résistance à l'ampicilline, a été réalisée en ressortant les CDS des plasmides pGEM easy. Très peu de clones transformants (entre 0 et 2 clones sur 12 clones testés par CDS) avec le plasmide pGEM easy ont été détectés. Malgré cela, aucun clone transformant contenant le plasmide pET3a avec la CDS donnée n'a pu être isolé, la plupart ne comportant que le pET3a vide.

Toutefois, les plasmides intermédiaires pGEM easy comportant les CDS ont été séquencés. Et, pour chacun des gènes étudiés (BMEI1249, BME1007, BMEI1829 et BMEI1830 pour Omp25 et, BMEI0844 et BR1622 pour Omp31), au moins un clone non muté a été construit.

Concernant les constructions des plasmides de surexpression des Omp25 et Omp31, une perspective consistant en une étape supplémentaire a été imaginée. Celle-ci consisterait à cloner les CDS extraites des pGEM easy dans un plasmide portant une autre résistance que l'ampicilline, telle que la résistance à la kanamycine. Ceci permettrait donc de ne sélectionner que les clones ayant intégrés ce nouveau vecteur parmi lesquels certains devraient comprendre la CDS donnée. De ce second plasmide intermédiaire, les CDS seraient à nouveau ressorties pour être finalement clonées dans le plasmide pET3a, et les transformants seraient sélectionnés sur milieu ampicilline. Ces constructions pourront dès lors être introduites dans la souche de surproduction BL21(DE3)pLysS, utilisée pour Omp2a et Omp2b.

Dans un second temps, il faudra mettre en œuvre les mêmes démarches que celles réalisées pour les Omp2a et Omp2b c'est-à-dire, vérifier que les OMPs sont surproduites en corps d'inclusion, les purifier, les renaturer et les concentrer pour finalement réaliser des essais de cristallogénèse afin de tenter de résoudre leur structure tridimensionnelle.

Toutefois, il n'a pas été établi que ces OMPs sont trimériques. Or, pour les Omp2a et Omp2b, c'est l'observation de trimères en SDS-PAGE qui nous a permis de dire qu'elles étaient renaturées. Par conséquent, une ou plusieurs autres techniques devront être mises au point.

L'une d'elles pourrait être l'analyse calorimétrique différentielle (DSC). Le principe utilisé est simple. En augmentant progressivement la température de la solution de protéines renaturées, on finit par atteindre la température à laquelle la protéine testée se dénature. Or, cette dénaturation libère de l'énergie. Par conséquent, il suffirait de mesurer la libération d'énergie par chauffage d'un lot de protéines renaturées pour déterminer si oui ou non elle a été renaturée. Sur le même principe, des mesures de fluorescence ou d'absorption à 280 nm peuvent être effectuées.

2 Protéines de la membrane externe du groupe 2: Omp2a et Omp2b

L'objectif pour ces OMPs a été atteint et le protocole mis au point est reproductible. En effet, Omp2a et Omp2b dont les séquences codantes sont clonées dans le plasmide pET3a, ont été surexprimées dans la souche *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Un premier protocole de renaturation au zwittergent 3-14 et de purification sur tamis moléculaire a été utilisé avant la mise au point d'une toute autre méthodologie. Ces OMPs ont, en effet, été purifiées sur colonne échangeuse d'anions (DEAE) pour ensuite être renaturées. Cette dernière étape a nécessité des essais de diverses conditions: choix du détergent, concentration en urée, concentration en NaCl... C'est finalement en ne modifiant pas la concentration en NaCl après purification et en renaturant avec une concentration finale de 2M urée avec le n-docecyl- β -D-maltopyranoside, dont la concentration finale est de dix fois sa CMC, que la renaturation la plus efficace a été observée. L'Omp2a, ainsi renaturée, a ensuite été concentrée à 22,6 mg/ml. Des premiers essais de cristallogénèse ont été réalisés sur les 48 conditions du kit MembFac (Hampton Research).

De là, les perspectives paraissent évidentes. Concernant l'Omp2a, il faudra lancer de nouveaux essais de cristallogénèse avec de nouvelles conditions jusqu'à l'obtention de cristaux. Lorsqu'une condition donnera des cristaux, restera alors à affiner la condition de sorte à obtenir des cristaux de qualité suffisante pour permettre la diffraction aux rayons X et la résolution de la structure 3D.

En ce qui concerne l'Omp2b, il faudra lui appliquer le même protocole de concentration mis au point sur l'Omp2a et lancer les premiers essais de cristallogénèse jusqu'à obtention de cristaux permettant la résolution de sa structure 3D.

Toutefois, il serait intéressant de montrer par un autre moyen que l'utilisation du SDS-PAGE et la visualisation de trimères que, les Omp2a et Omp2b sont renaturées par le protocole mis au point. La technique de l'analyse calorimétrique différentielle pourrait également s'appliquer.

Une fois les structures 3D de ces deux OMPs résolues, il sera intéressant de comparer leurs structures notamment au niveau du diamètre du pore formé, des charges retrouvées dans le pore ... Et, de mettre ces différences en parallèle avec les divergences de séquences entre ces OMPs.

En règle générale pour les OMPs étudiées dans ce travail, l'obtention de leurs structures 3D permettrait de réaliser des mutagenèses dirigées de résidus soit parce qu'ils sont variables

entre les différentes séquences analogues ou entre les différentes souches soit parce qu'ils appartiennent à une boucle extramembranaire suspectée de jouer un rôle dans l'obturation du pore ou de réaliser des interactions. Les résidus conservés entre homologues d'OMP, potentiellement impliqués dans une fonction conservée depuis un ancêtre commun, pourraient aussi être mutés spécifiquement en vue de tester la fonction résiduelle des mutants et donc préciser le rôle de ces résidus conservés.

A une plus large échelle, on pourrait essayer d'obtenir les structures 3D d'autres OMPs. Les OMPs majeures d'autres souches, par exemple celle de l'Omp2a de *Brucella abortus* qui présente une délétion importante conduisant certainement à des modifications structurales. Il sera également possible de modéliser la structure 3D d'OMP homologues. Les OMPs mineures pourraient elles aussi être intéressantes à cristalliser, car elles peuvent réaliser des fonctions essentielles (Genevrois, Steeghs et al. 2003). Au niveau de la cristallographie des protéines membranaires, beaucoup de travail reste à accomplir ouvrant la voie à de nombreuses expérimentations visant à la caractérisation fonctionnelle de ces protéines.

Matériel et méthodes

1 Matériel

1.1 Souches et plasmides

1.1.1 Souches

- *Escherichia coli* DH10B (Gibco BRL, Invitrogen)

Cette souche d'*E. coli* est utilisée afin d'amplifier l'ADN plasmidique. *E. coli* n'étant pas naturellement capable d'effectuer la transformation, la technique de transformation thermique sur cette souche rendue compétente est pratiquée.

Génotype: F- *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, $\Delta(ara, leu)7697$, *galU*, *galK*, λ^- , *rspL*, *nupG*) (*SmR*)..

- *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen)

Cette souche d'*E. coli* est utilisée pour la surproduction protéique. Le plasmide pLysS comporte la CDS du lysozyme T7. Le lysozyme T7 réduit le niveau d'expression basale du gène cible qui est sous le contrôle d'un promoteur T7. Cette répression est levée par une induction à l'IPTG, un analogue non hydrolysable de l'allolactose, un isomère du glucose.

Génotype: F-, *ompT*, *hsdS_B* (*r_B*-, *m_B*-), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pLysS, Cm^r.

1.1.2 Plasmides

- pGEM-T easy et pGEM easy

Le pGEM-T easy (Figure 26) est un vecteur Promega utilisé pour le clonage de produit PCR. Il est porteur du gène de résistance à l'ampicilline et permet le test blanc/bleu. Ce vecteur est préalablement coupé par *EcoRV* et une thymine (T) a été ajoutée à chaque extrémité 3'. Ces T en 3' permettent une ligation efficace avec les produits PCR générés avec une adénine protrudante par certaines polymérases telles que la *Taq* DNA polymérase. Ce vecteur est un plasmide répliquatif *high copy*.

Le pGEM easy est un produit dérivé du pGEM-T easy réalisé au labo (URBM). Les T aux extrémités 3' ont été ôtées créant ainsi le site *EcoRV* bordé par divers sites de restriction dont deux sites *EcoRI* situés de part et d'autre.

- pET3a

Ce vecteur (Figure 27) de chez Novagen est destiné à la surexpression et code pour le gène de résistance à l'ampicilline. Des sites uniques tels que *NdeI* et *BamHI* peuvent être utilisés pour l'insertion dirigée d'une séquence codante sous le contrôle d'un promoteur fort, le promoteur T7.

- pET2a et pET2b

Ces plasmides, pET2a et pET2b, sont des vecteurs pET3a au sein desquels ont été insérées les CDS des Omp2a et Omp2b respectivement.

1.2 Milieux de culture, additifs, tampons et solutions

1.2.1 Milieux de culture pour E. coli: Milieu riche Luria Bertani (LB) (Invitrogen)

Pour un litre d'eau désionisée	Milieu liquide	Milieu solide ou agar
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	15 g

Avant utilisation, les milieux sont autoclavés 20 minutes à 120°C. Une fois la température refroidie jusqu'à environ 55°C les additifs tels que les antibiotiques sont incorporés. Après homogénéisation, le milieu solide est coulé dans des boîtes de pétri. Ces dernières peuvent être conservées à 4°C après durcissement et séchage du milieu.

1.2.2 Additifs: antibiotiques et autres

Noms	Abréviations	Solutions de dissolution	Concentrations stocks	Concentrations finales
Ampicilline	Amp	H ₂ O	100mg/ml	100µg/ml
Chloramphénicol	Cm	Ethanol 100%	20mg/ml	20µg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	IPTG	H ₂ O	24mg/ml	48µg/ml

Chaque additif est stérilisé par filtration à 0,22 µm (Millipore) et les aliquots (~ 1 ml) sont conservés à -20°C.

1.2.3 Tampons et solutions

Tampon TEN (pH = 8,0)

- 50 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- 1 g/l NaCl (ou 17 mM)

Tampon de lavage des corps d'inclusion (pH = 8,0)

- 2 M Urée
- 20 mM Tris-HCl
- 500 mM NaCl
- 2% Triton X-100

Tampons et solutions pour l'électrophorèse sur gel d'agarose

Tampon TAE (50X) (pH=8,0)	Bromure d'éthidium	Alourdisseur
40 mM Tris-HCl 50 mM EDTA 57,1 ml acide acétique froid Porter à 1 litre avec de l'eau distillée	2 mg/ml d'eau distillée	50% Glycérol 100 mM EDTA 1% SDS Bleu de bromophénol

Tampons S1, S2 et S3

Tampon S1 (4°C)	Tampon S2	Tampon S3
50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 mg/ml RNase A	200 mM NaOH 1% SDS	2,8 M KAc pH= 5,1

Solutions pour le SDS-PAGE*Gels de polyacrylamide*

Gel de séparation (15%) (15 ml / 2 gels) (ml)		Gel d'empilement (5 ml / 2 gels) (ml)	
H ₂ O	5	H ₂ O	3,0
38,5% acrylamide/bis solution premixed ⁽¹⁾	5,9	38,5% acrylamide/bis solution premixed	0,65
1,5 M Tris pH 8,8	3,8	0,5 M Tris pH 6,8	1,25
10% SDS	0,15	10% SDS	0,05
10% APS ⁽¹⁾	0,15	10% APS	0,05
TEMED ⁽¹⁾	0,012	TEMED	0,005

⁽¹⁾ Bio-Rad*Tampon d'échantillon*

- 3,55 ml H₂O
- 1,25 ml de tampon Tris-HCl 0,5M à pH 6,8
- 2,5 ml de glycérol
- 2 ml SDS 10%
- 0,2 ml de bleu de bromophénol 0,5%

On additionne 50 µl de β-mercaptoéthanol à 950 µl du mélange décrit ci-dessus.

Tampon de migration SDS-PAGE (10X)

- 250 mM Tris-HCl (30,35 g/l)
- 144 g de Glycine
- 10 g de SDS (port du masque tant qu'il est sous forme solide)
- Porter à 1 litre avec de l'eau distillée

Coloration au bleu de Coomassie

Bleu de Coomassie	Solution de décoloration
0,25 g de bleu de Coomassie R 45 ml de méthanol technique 10 ml d'acide acétique technique Porter à 100 ml avec de l'eau désionisée	300 ml de méthanol technique 100 ml d'acide acétique technique Porter à 1 l avec de l'eau désionisée

Coloration au nitrate d'argent: cfr Méthodes au point 2.3.1

Tampon d'élution pour la chromatographie d'exclusion (pH = 8,0)

- 50 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- 1 g/l NaCl (ou 17 mM)
- 0,5% de Zwittergent 3-14 (Anatrace)

Tampons pour la chromatographie échangeuse d'anions et la renaturation (pH = 8,0)

Tampon A	Tampon B	Tampon C	Tampon D
50 mM Tris-HCl 17 mM NaCl (soit 1 g/l) 8 M Urée	50 mM Tris-HCl 500 mM NaCl 8 M Urée	50 mM Tris-HCl 250 mM NaCl	50 mM Tris-HCl 50 mM NaCl

2 Méthodes

2.1 Techniques relatives aux bactéries

2.1.1 Transformation bactérienne par choc thermique

Cette technique a pour but de faire entrer de l'ADN exogène, tel l'ADN plasmidique, dans une bactérie compétente.

- Dégeler les bactéries CaCl_2 compétentes sur glace pendant 20 minutes
- A 100 μl de bactéries, ajouter 10 μl d'ADN plasmidique et homogénéiser en douceur
- Incuber 30 minutes sur glace
- Réaliser le choc thermique pendant 2 minutes dans un bain-marie à 42°C
- Ajouter 1 ml de LB liquide
- Incuber 1 heure à 37°C
- Etaler 100 μl sur le milieu sélectif adéquat et incuber sur la nuit à 37°C
- Centrifuger le restant 5 minutes à 5000 rpm et resuspendre le culot dans 100 μl de LB liquide
- Etaler sur le milieu sélectif adéquat et incuber sur la nuit à 37°C

2.1.2 Surexpression protéique en culture bactérienne

Le principe de cette technique est d'induire la production d'une protéine d'intérêt lors de la croissance exponentielle de la culture bactérienne. Pour ce faire, des bactéries de souches *E. coli* BL21(DE3)pLysS ont été préalablement transformées avec un plasmide de type pET, ici

pET3a, contenant la CDS de la protéine d'intérêt sous le contrôle de promoteur T7. L'expression de la protéine d'intérêt et de l'ARN polymérase T7, encodée dans le génome *E. coli*, est réprimée par le répresseur *lac*. Ce dernier est codé dans le génome d'*E. coli* et dans le plasmide pET. L'expression de la protéine d'intérêt est induite par l'ajout d'IPTG, un analogue non hydrolysable de l'allolactose, dans le milieu de culture levant la répression établie par le répresseur *lac*. Toutefois, en l'absence d'IPTG, une production basale de l'ARN polymérase T7 et, par conséquent, de la protéine d'intérêt est possible. Pour y remédier, la souche d'*E. coli* utilisée possède le plasmide pLysS. Ce dernier code pour le lysozyme T7 capable de se lier à l'ARN polymérase T7 et réprimant ainsi l'expression de la protéine d'intérêt. Le plasmide pET code pour la résistance à l'ampicilline et le plasmide pLysS pour le gène de résistance au chloramphénicol (Figure 28).

- Réaliser une préculture bactérienne: inoculer 10 ml de LB liquide, avec Amp et Cm, et incubé sur la nuit avec agitation à 37°C
- Inoculer 200 ml de LB liquide, avec Amp et Cm, avec 2 ml de préculture dans un Erlenmeyer à pales de 1 litre
- Incuber la culture à 37°C avec agitation jusqu'à obtenir une densité optique à 600 nm (DO) située entre 0,6 et 0,8
- Induire la surproduction protéique par ajout de l'IPTG et incubé 3h avec agitation à 37°C
- Centrifuger 30 minutes à 4000 rpm et à 4°C
- Jeter le surnageant et conserver le culot bactérien à -20°C ou poursuivre par la lyse (cfr point suivant)

2.1.3 Lyse bactérienne et lyse des corps d'inclusion

Cette technique a pour but de récupérer la protéine d'intérêt surproduite en corps d'inclusion sous forme dénaturée et solubilisée.

- Resuspendre le culot bactérien dans 6 ml de tampon TEN et incubé 20 minutes à température ambiante
- Ajouter 8 mg de sel de déoxycholate de sodium et incubé 1 heure à 37°C avec agitation
- Ajouter 2 mg de DNaseI et incubé 1 heure à température ambiante
- Centrifuger 20 minutes à 14000g et à 4°C
- Lavage des corps d'inclusion (2X): resuspendre le culot avec 10 ml de tampon de lavage de corps d'inclusion et centrifuger 20 minutes à 14000g et à 4°C
- Jeter le surnageant
- Solubiliser les corps d'inclusion avec 6 ml tampon TEN fraîchement additionné de 8M urée
- Incuber sur la nuit avec une faible agitation à température ambiante afin de resuspendre le culot

2.2 Techniques relatives à l'ADN

2.2.1 Polymerase chain reaction (PCR)

Cette technique permet l'amplification d'une séquence donnée en ADN (amplicon) pour laquelle des amorces oligonucléotidiques, ou *primers*, complémentaires ont été conçues. La condition *sine qua none* est de connaître les séquences bordant la séquence d'intérêt. Une première étape sera de dénaturer par chauffage à 95°C la matrice d'ADN mise en présence de dNTPs (Bioline), des deux amorces (*forward* et *reverse*) et de la polymérase thermorésistante.

Notons que pour les PCR sur colonies, la matrice d'ADN est remplacé par quelques bactéries récupérées au bout d'un tips. Au cours de ce travail, la *Taq* DNA polymérase (Promega) a été utilisée pour les PCR diagnostiques et la *Phusion* High-Fidelity DNA polymérase (Finnzymes), une polymérase à haute fidélité, pour l'obtention de séquences codantes à partir d'ADN génomique. La température est ensuite réduite pour permettre l'hybridation des amorces et l'élongation par la polymérase. Le cycle de dénaturation, hybridation et élongation est répété jusqu'à obtenir la quantité d'ADN voulue.

Mix pour la PCR

Réactifs	Quantités pour la <i>Taq</i>	Quantités pour la <i>Phusion</i>
Tampon de la polymérase (5X)	10 µl	10 µl
Mix dNTPs (5mM de chaque)	2 µl	2 µl
Amorce <i>forward</i> (20 µM)	2 µl	0,5 µl
Amorce <i>reverse</i> (20 µM)	2 µl	0,5 µl
Polymérase	0,25 µl (5U/µl)	0,5 µl (2U/µl)
Matrice	1 µl	0,5 µl
Eau distillée stérile	Portée à 50 µl	Portée à 37 µl

Programme PCR

Étape du cycle	Pour la <i>Taq</i>	Pour la <i>Phusion</i>
Dénaturation	4 minutes à 95°C	30 secondes à 98°C
Amplification :	25 cycles	30 cycles
Dénaturation	45 secondes à 95°C	10 secondes à 98°C
Hybridation des amorces	45 secondes à X°C ¹	30 secondes à X°C ¹
Élongation	Y ² minutes à 72°C	30*Y ² secondes à 72°C
Elongation finale	10 minutes à 72°C	10 minutes à 72°C

¹ X= T_m – 10°C. La T_m ou température de *melting* est calculée sur base la taille de l'amorce, uniquement la partie s'hybridant lors de la première hybridation, selon l'équation: $T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T)$

² Y est égale à la taille en Kbp (kilobase) du fragment à amplifier.

Amorces utilisées

Les amorces pour *omp2a* et *omp2b* avaient préalablement été construites par J.-Y. Paquet lors de sa thèse (Paquet 2000). En ce qui concerne les autres amorces, plusieurs points ont été tenus en compte. Premièrement, étant donné que l'intention est de surproduire ces OMPs en corps d'inclusion, le peptide signal doit être exclu. Le peptide signal est prédit à partir des séquences codantes des OMPs par deux systèmes de calcul trouvés sur Internet:

- <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html

Les peptides signaux obtenus prédits ont été identiques sur les deux sites. Une fois la séquence du peptide signal prédit ôté, le premier codon de la CDS est remplacé par le codon *start* ATG. Ce n'est qu'à partir de ces séquences que les amorces ont été conçues de sorte à insérer un site de restriction *NdeI* (5' CA[^]TATG 3') en amont et un site de restriction *BamHI* (5' G[^]GATCC 3') en aval de la CDS après avoir vérifié que ces sites n'étaient pas déjà présents au sein des CDS. Les amorces sont synthétisées par Eurogentec S.A.

Gène amplifié	Nom de l'amorce	Séquence
<i>omp2a</i> ou BMEI1306	2aF	5' GCGGATCCCATATGGACGCAATCGTCGCGCCA 3'
	2aR	5' AAGAAAGCTTATCGATTCTCAGCTTTCGT 3'
<i>omp2b</i> ou BMEI1305	2aF	5' GCGGATCCCATATGGACGCAATCGTCGCGCCA 3'
	2bR	5' GGATCCGGTCAGCATAAAAAGCAAGC 3'
BMEI1007	BMEI1007F	5' GGCATATGGACGCCGTCATTGAACAG 3'

Gène amplifié	Nom de l'amorce	Séquence
	BMEI1007R	5' GGGGATCCTTAGAACTTGTAAGCTACGC 3'
BMEI1249	BMEI1249F	5' GGCATATGGACGCCATCCAGGAACAG 3'
	BMEI1249R	5' GGGGATCCTTAGAACTTGTAAGCCGATGCCGA 3'
BMEI1829	BMEI1829F	5' GGCATATGTGCTGACGCCGTCATTGA 3'
	BMEI1829R	5' GGGGATCCTCAGAACTTGTAAGCGACAC 3'
BMEI1830	BMEI1830F	5' GGCATATGGATGCCATTGTTGCGCAG 3'
	BMEI1830R	5' GGGGATCCTCAGAACTTATAGGCAACGC 3'
BMEI0844	BMEI0844F	5' GGCATATGGACGTGGTTGTTTCTGAAC 3'
	BMEI0844R	5' GGGGATCCTTAGAACTTGTAAGTTCAGACC 3'
BR1622	BR1622F	5' GGCATATGGACATCATCGTTGCTGAAC 3'
	BR1622R	5' GGGGATCCTTAGAACTTGTAAGTTCAGACC 3'

2.2.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose a pour but de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille grâce à un champ électrique dans une cuve contenant le tampon TAE (1X). La migration d'un marqueur comprenant des fragments d'ADN de tailles connues permet de déterminer la taille des fragments des échantillons testés. Le marqueur utilisé est le GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas) (Figure 29). Une estimation de la quantité d'ADN peut également être réalisée sur base de ce marqueur. Lors de la préparation du gel d'agarose, du bromure d'éthidium y est ajouté avant polymérisation. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant qui permet de révéler les fragments d'ADN sous une lampe UV. La fluorescence observée est proportionnelle à la taille du fragment et à sa quantité. Avant chargement, de l'alourdisseur, d'un volume minimum ou égale à un dixième du volume de l'échantillon, doit être ajouté.

- Dissoudre par chauffage 1g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1X frais
- Couler le gel dans le support adéquat
- Ajouter et répartir de manière homogène 5 µl de bromure d'éthidium dans l'agarose
- Ajuster les peignes et laisser polymériser
- Retirer les peignes, placer le gel dans la cuve contenant le tampon TAE (1X) et charger les échantillons et le marqueur (5 µl/puits)
- Faire migrer à 100 volts pendant 30 à 45 minutes
- Révéler le gel sous la lampe UV

2.2.3 Restriction sur plasmide

La restriction d'un plasmide est le clivage de celui-ci par des enzymes dites "de restriction". Ces enzymes sont des endonucléases d'origine bactérienne reconnaissant des séquences nucléotidiques courtes de 4 à 8 nucléotides. La restriction diagnostique permet de vérifier que le plasmide restreint correspond à celui attendu grâce aux nombres et à la taille des fragments obtenus. La restriction de plasmide est également utilisée pour les constructions de plasmides.

- 1 µl de tampon (10X) A, B, L, H ou M (Roche) selon l'enzyme
- 1 µl d'enzyme (Roche)
- X µl de plasmide
- Porter à un volume de 10 µl avec de l'eau distillée
- Incuber 1 heure au bain-marie à 37°C

L'enzyme de restriction doit toujours être à volume inférieur ou égale à 1/10 du volume total.

2.2.4 Ligation de plasmide

Lors de construction de plasmides, la ligation permet de cloner un insert dans le plasmide préalablement linéarisé. A noter que si les extrémités sont protudantes, elles doivent être complémentaires.

- Vecteur et insert sont dans un rapport 1/1 pour un clonage directionnel et dans un rapport de 1/3 pour un clonage non directionnel
- 4 µl de tampon T4 DNA ligase (5X) (Invitrogen)
- 1 µl de T4 DNA ligase (5U/µl) (Invitrogen)
- Porter à 20 µl avec de l'eau distiller
- Incuber sur la nuit à 16°C ou 2 heures à température ambiante

2.2.5 Purification sur colonne

Cette technique est utilisée pour purifier les produits PCR ou les produits de restriction (avant une ligation). Le kit utilisé est le MSB[®] spin Rapace d'Invitex. Un volume maximum de 50 µl peut être purifié sur une colonne.

- Mélanger par pipetage et vortex 250 µl de *Binding Buffer* à l'ADN à purifier
- Déposer le mélange sur le filtre placé dans un tube récepteur de 2 ml
- Centrifuger 3 minutes à 12000 rpm
- Placer le filtre sur un autre tube (1,5 ml) et déposer 10 ou 20 µl d'eau distillée
- Incuber 1 minute à température ambiante
- Éluer l'ADN par centrifugation 1 minute à 10000 rpm

2.2.6 Minipréparation de plasmide

Cette technique permet d'isoler et de purifier de l'ADN plasmidique. L'opération s'organise en 5 étapes: la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de ce dernier et finalement, sa resuspension.

- Réaliser une culture (avec l'antibiotique correspondant) de 5 ml inoculée avec le clone voulu et incuber sur la nuit avec agitation à 37°C
- Centrifuger 1,5 ml de culture 5 minutes à 13000 rpm et vider le surnageant. Cette étape peut être répétée 2 voire 3 fois pour obtenir plus d'ADN.
- Resuspendre le culot avec 300 µl de tampon S1*
- Ajouter 300 µl de tampon S2* et mélanger par inversion
- Incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 300 µl de tampon S3* et mélanger par inversion
- Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm et recupérer le surnageant
- Ajouter 630 µl d'isopropanol
- Centrifuger 20 minutes à 13000 rpm et vider le surnageant
- Ajouter 1 ml d'éthanol 70% froid (-20°C)
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm et vider le surnageant
- Sécher les culots 10 minutes au Speed Vac (séchage par le vide)
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau distillée

* Les tampons S1, S2 et S3 sont issus du kit NucleoBond® de Macherey-Nagel. Le tampon S1 doit être additionné de RNaseA (fournie avec le kit) avant utilisation et conservé à 4°C. Leur compositions respectives sont indiquées dans la partie Matériel.

2.2.7 Midipréparation de plasmide

Le principe est le même que pour la minipréparation mais ici la culture est de 100 ml. Le protocole suivi est celui indiqué par le kit NucleoBond® de Macherey-Nagel.

2.2.8 Séquençage

Le séquençage, comme l'indique le nom, est une technique visant à déterminer la séquence nucléotidique d'une portion d'ADN. Le séquençage est basé sur la méthode de Sanger qui consiste à amplifier la séquence avec des dNTP et une fraction de ddNTP, ou didésoxyribonucléotides, couplés à un fluorochrome de couleur spécifique en fonction de la base A, C, T ou G. La réaction induit la formation de fragments de toutes tailles dont l'analyse permet de déterminer la séquence nucléotidique de la portion d'ADN voulu. Le séquençage est réalisé par un autre laboratoire des FUNDP et ce, à partir du mélange suivant:

- 0,5 µl d'une amorce (*forward* ou *reverse*) à 20 µM
- 100 ng de plasmide
- Porter à 12 µl avec de l'eau distillée stérile

Pour une séquence donnée, le séquençage peut être réalisé dans les deux sens si nécessaire, une fois avec chaque amorce.

2.3 Techniques relatives aux protéines

2.3.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante est une technique permettant de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le gel réticulé est obtenu par la polymérisation d'acrylamide formant les chaînes et de bis-acrylamide formant les ponts entre les chaînes. Cette réaction est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) (Bio-Rad) qui crée des radicaux libres et est catalysée par le N,N,N',N'-tétraméthyl-1-,2-diaminométhane (TEMED) (Bio-Rad), une substance toxique. Le SDS, un détergent anionique fort contenu dans le gel (et le tampon de migration), va induire un dépliement des chaînes polypeptidiques et les charger négativement. Ainsi, au plus la protéine a un poids moléculaire élevé, au plus elle sera chargée négativement. Avant migration, les protéines sont dénaturées par la chaleur. La séparation des protéines se fait grâce à l'application d'un champ électrique. Les plus petites protéines migrent plus rapidement dans le gel et donc plus loin que les plus grandes protéines. Afin d'estimer le poids moléculaire, un marqueur contenant des protéines de poids moléculaires connus est déposé dans l'un des puits jouxtant les échantillons. Deux types de gels sont à préparer: le gel de séparation (*running gel*) et le gel d'empilement (*stacking gel*). Le premier est le gel qui permettra la séparation des protéines. Le pourcentage d'acrylamide de ce gel est ajustable en fonction des poids moléculaires des protéines à faire migrer. Le gel d'empilement est le premier rencontré par les échantillons et permet de compacter les protéines ce qui permet d'obtenir une meilleure résolution de séparation par la suite. Les gels sont coulés dans des cassettes plastiques à usage unique (cassettes 1,0 mm d'Invitrogen).

Protocole

Le premier gel à couler est le gel de séparation, ici de 15% en acrylamide, au dessus duquel est versé du butanol ou de l'éthanol saturé en eau. Ceci évite au gel de polymériser avec l'oxygène et de créer un gradient. Une fois polymérisé, le butanol ou l'éthanol est retiré, le gel d'empilement est coulé et le peigne, formant les puits est ajusté. Lorsque le gel est polymérisé, le peigne est doucement retiré et le gel est placé dans la cuve (Invitrogen), les puits dirigés vers le centre de la cuve. Faire attention à bien retirer la bande autocollante au bas de la cassette pour permettre au courant de passer. La partie externe de la cuve est remplie de tampon de migration. A 10 µl d'échantillon, un même volume de tampon d'échantillon est ajouté. Les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C sauf dans les cas où il s'agit de protéines renaturées. Lorsqu'il s'agit uniquement de vérifier une surproduction protéique, les culots d'1 ml de culture avant induction et 1 ml de culture après induction peuvent être directement resuspendu dans 50 µl de tampon d'échantillon. Les échantillons et le marqueur (*Precision Plus ProteinTM Standards* de Bio-Rad) (Figure 30) peuvent être déposés dans les puits et la partie centrale de la cuve est remplie de tampon de migration jusqu'à ce que les puits soient en contact avec le tampon. La cuve est refermée, les électrodes connectées et le générateur est enclenché sur 200 volts. La migration dure environ 45 minutes. Lorsque le front de migration atteint le bas du gel, la migration est stoppée. La cassette est cassée pour ressortir le gel qui est rincé à l'eau distillée.

Coloration au bleu de Coomassie

- Le gel rincé est déposé dans un bain de solution de bleu de Coomassie
- Incuber au moins 1 heure avec une légère agitation
- Récupérer la solution de bleu de Coomassie
- Verser la solution de décoloration sur le gel et incuber sur la nuit. Remplacer la solution de décoloration si nécessaire

Coloration au nitrate d'argent

Cette méthode de coloration est plus sensible que la précédente et sa limite de détection se trouve entre 1 et 10 ng selon la protéine et le temps de développement. La coloration au nitrate d'argent est souvent utilisée à suite de la coloration au bleu de Coomassie lorsque celle-ci n'a pas été satisfaisante. Le gel est préalablement lavé dans de l'eau distillée au minimum 2 heures et idéalement sur la nuit. Le gel est ensuite passé d'un bain à l'autre comme indiqué ci-dessous.

Etapes	Solutions (250 ml)	Temps (minutes)
1 Fixation	25 ml d'acide acétique, 100ml de méthanol, 125 ml d'eau	15
2 Fixation	25 ml d'acide acétique, 100ml de méthanol, 125 ml d'eau	15 min à 18h
3 Sensibilisation ¹	75 ml de méthanol, 10 ml thiosulfate de sodium 5% (500mg), 17 g acétate de sodium, 165 ml d'eau	30
4 Lavage (3X)	250 ml d'eau	5
5 Argent	25 ml de nitrate d'argent 2.5% (625mg), 225 ml d'eau	20
6 Lavage (2X)	250 ml d'eau	1
7 Développement	6.25 g de carbonate de sodium, 100 µl de formaldéhyde, 250 ml d'eau	X ²
8 Arrêt de la réaction	3.65g EDTA, 250 ml d'eau	10
9 Lavage (3X)	250 ml d'eau	5

¹ Après cette étape, toute zone touchée ou prise en main sera assombrie au cours du développement.

² Le développement est arrêté dès l'apparition des spots ce qui peut prendre entre 10 et 15 minutes.

2.3.2 Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion (stérique) ou tamis moléculaire ou filtration sur gel permet de purifier et de séparer les différents composants d'un échantillon en fonction de leur taille. La colonne se compose de dextran et de glucose réticulés sous forme de bille. Le degré de réticulation définit la porosité des billes. Dès lors, les molécules trop grandes pour entrer dans les billes sont les premières à sortir. Quant aux petites et moyennes molécules, leur migration est freinée par leur entrée dans les billes, elles sont donc éluées plus tardivement comme le présente le chromatogramme théorique ci-contre (Figure 31). Dans le cadre de ce travail, cette technique a été utilisée afin de séparer les formes monomériques, dimériques, trimériques et les agrégats des Omp2a et Omp2b après renaturation. Pour ce faire, on a utilisé l'appareillage AktäPurifier (GE Healthcare) sur lequel la colonne Superdex 200 (GE Healthcare) a été raccordée. La fourchette de séparation de cette colonne est de 10 à 600 kDa. Les échantillons protéiques doivent préalablement être filtrés (filtre pour seringue de 0,22 µm Millipore). Le tampon d'élution est également filtré (filtre de 0,22 µm Millipore). Le flux utilisé est de 0,25 ml/minute et les fractions récupérées par 1 ml.

- Lavage de la colonne à l'eau distillée
- Équilibration de la colonne avec le tampon d'élution (25 ml)
- Injection de 100 µl d'échantillon sur la colonne
- Purification avec le tampon d'élution et récupération des fractions

2.3.3 Dialyse de protéines

Cette technique permet de modifier la composition du tampon dans lequel est solubilisée une protéine et utilise le principe d'osmose. En effet, la protéine ne passe pas au travers de la membrane de dialyse. Dans ce cas-ci, il s'agit de réduire la concentration en NaCl. Dans un berlin, 500 ml (et idéalement 1l) du tampon voulu au final est préparé. La membrane de dialyse de cut-off allant de 6000 à 8000 daltons (*Spectra/Por 1 Dialysis Membrane* MWCO de Spectrum), est imbibée de tampon (travailler avec des gants). Une pince est disposée à une extrémité de la membrane. Par l'autre extrémité, la membrane est remplie avec la solution protéique à dialyser après quoi cette seconde extrémité est refermée par une autre pince. La membrane remplie est immergée dans le tampon et incubée sur la nuit (à 4°C lorsque la protéine est native) avec une légère agitation via l'utilisation d'un agitateur magnétique. Il suffit ensuite de récupérer la solution protéique se trouvant dans la membrane.

2.3.4 Chromatographie échangeuse d'anions

Cette seconde technique de chromatographie sépare les molécules en fonction de la charge nette qu'elles portent à leur surface. La charge nette d'une molécule est fortement dépendante du pH. La chromatographie d'exclusion se base sur le principe selon lequel le rapport entre la charge nette en surface et le pH est unique pour une protéine spécifique. A un pH supérieur à la valeur du point isoélectrique (pI) d'une molécule, cette dernière est chargée négativement et va donc pouvoir se lier à une colonne chargée positivement soit à une colonne échangeuse d'anions. Les valeurs des pI calculés sont de 4,27 et de 4,42 pour Omp2a et Omp2b respectivement. C'est donc via le contrôle des interactions entre les charges de la molécule et les charges contraires de la colonne par l'application d'un gradient de contre ions que l'on peut favoriser l'accrochage ou l'élution de molécules pour les séparer. En effet, les contre ions entreront en compétition avec la molécule à purifier pour la liaison à la colonne.

Une telle purification se réalise en différentes étapes décrites ci-dessous. Mais, dans un premier temps, la sepharose DEAE CL-6B (Pharmacia LKP) est emballée dans une colonne prévue à cet effet. Après purification, elle sera conservée à 4°C. Les tampons utilisés et les échantillons sont préalablement filtrés (filtre 0,22 µm) (Millipore)

- Lavage du système de purification (Bio-Rad Biologic LP) à l'eau distillée
- Lavage du système avec le tampon A et avec le tampon B pour le tuyau d'arrivée de ce tampon
- Connexion de la colonne sur le système et équilibration de celle-ci avec le tampon A
- Injection de l'échantillon
- Elution du flow-through²⁰ avec le tampon A: flux de 1 ml/min et fractions récupérées par 3 ml
- Une fois la courbe d'absorbance à 280 nm stabilisée à 0 (auto-zéro réalisée sur le tampon A) après la sortie du flow-through, l'élution de l'OMP est engagée. Le gradient en NaCl est obtenu via le mélange progressif de tampon A au tampon B par une pompe. Sur 25 ml, on passe de 0 à 100% de tampon B²¹ avec un flux de 1 ml/min et des fractions récoltées par 1 ml.
- Si à la fin gradient, toute l'OMP n'a pas été éluée, l'élution est poursuivie avec le tampon B. (flux de 1 ml/min et fraction de 1 ml)
- Après purification, la colonne est lavée avec du NaOH 1M et l'on vérifie qu'il n'y ait plus de protéine éluée. Elle est ensuite lavée avec de l'eau distillée et enfin avec de l'éthanol 20% dans lequel elle est conservée à 4°C.

2.3.5 Concentration de protéines

La concentration des protéines est réalisée par l'utilisation d'Amicon Ultra-15 (Millipore). Il s'agit de falcon de 50 ml comportant un compartiment supérieur dans lequel la protéine à concentrer est déposée (< de 15 ml). Ce compartiment est séparé du falcon par un filtre de cut-off de 10 kDa. Avant une première utilisation, l'Amicon est rincé à l'eau distillée par centrifugation (5 minutes à 3000 rpm). Des centrifugations successives de 5-10 minutes à 3000 rpm sont effectuées jusqu'à obtention de la concentration protéique voulue (mesurée par absorbance à 280 nm). Entre chaque centrifugation, la solution protéique concentrée est resuspendue pour prévenir d'une éventuelle précipitation. Après utilisation, l'Amicon est rincé à l'eau distillée par centrifugation et est ensuite conservé dans de l'éthanol 20% à 4°C. Le filtre ne peut jamais être à sec une fois utilisé.

Lorsque ce sont des protéines renaturées qui sont concentrées, les centrifugations se font à 4°C.

²⁰ Le flow-through se compose des protéines incapables de se lier à la colonne. Dans le cas de l'échangeuse d'anions, il s'agit des molécules chargées positivement ou non chargées.

²¹ La compétition entre la ou les protéine(s) et les ions Cl⁻, dont la concentration augmente progressivement, induit l'élution en fonction de la charge nette en surface de la ou des protéine(s). Les protéines les moins chargées sont les premières éluées.

2.3.6 Renaturation de protéines

L'étape de renaturation des protéines, ici des OMPs, est essentielle dans ce travail. La technique appliquée est simple et est illustrée ci-contre (Figure 32). Un détergent donné, dissout dans le tampon adéquat, est vortexé en continue. A ce détergent est additionné goutte à goutte un volume égal d'OMPs dénaturées. Cette méthode permet la renaturation homogène des OMPs. Les OMPs ainsi renaturées sont ensuite soniquées dans un bain sonicant pendant une heure. Cette étape permet d'éviter les agrégats et son efficacité a été montrée au cours du mémoire (Figure 17 B).

2.3.7 Cristallogenèse

La solubilité de macromolécules, telles que les protéines, dépend de nombreux paramètres (pH, température, additifs,...). La cristallisation apparaît lorsque la solubilisation de la protéine diminue jusqu'à être en sursaturation, état propice à la formation de cristaux, en évitant toutefois d'aller jusqu'à précipiter. La technique de cristallisation utilisée est la diffusion de vapeur en goutte suspendue, technique largement répandue. Les conditions de cristallogenèse testées sont celles du kit MembFac (Hampton Research) (Figure 25). Les paramètres variables dans ce kit (MembFac) sont le pH, le tampon, le type de sel et l'agent précipitant. Concernant le pH, cinq valeurs différentes sont testées: 4,6; 5,6; 6,5; 7,5 et 8,5. Les tampons combinés à ces valeurs de pH sont, respectivement, l'acétate de sodium, le citrate de sodium, l'ADA (Adénosine déaminase), l'HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazone-n-2-Ethanesulfonic Acid) sodium et le tampon Tris-HCl. Enfin, les trois types d'agents précipitants utilisés, seuls ou combinés, sont des agents volatils, des agents non-volatils et des sels. Le lancement des essais de cristallogenèse se fait comme suit.

- Dans un puits d'une plaque 24 puits (Hampton Research), déposer 500 µl de tampon d'une condition donnée
- Disposer de la graisse sur le contour du puits
- Déposer au centre d'une lame ronde en verre siliconée (Hampton Research) 2 µl de la solution protéique à cristalliser et 2 µl de tampon de la condition correspondante
- Retourner la lame et la déposer, goutte vers le bas, au dessus du puits
- Vérifier que la graisse se trouve sur tout le contour et que le montage soit bien hermétique
- Répéter ces mêmes étapes avec les 47 autres conditions
- Laisser incubé à température ambiante entre 1 semaine et une durée indéterminée. Le temps de cristallisation varie d'une molécule à l'autre.
- Réaliser des observations régulières au binoculaire

Un schéma de la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue se trouve ci-contre (Figure 33).

Le tout n'est pas seulement d'obtenir des cristaux, encore faut-il que ces derniers soient exploitables. Ainsi, la qualité des cristaux influencera la résolution lors de la diffraction aux rayons X. C'est pourquoi, la protéine doit à la base être homogène et la plus pure possible. Et, lorsqu'une condition d'un kit de cristallogenèse donne des cristaux, il faut tester toute une série de conditions proches afin d'optimiser la résolution. Les composantes pouvant être modifiées sont le pH, le sel, la concentration de l'agent précipitant, la concentration de la protéine, les additifs, etc ... (Hunte, Jagow et al. 2003)

Références bibliographiques

- Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.
- Alba, B. M. and C. A. Gross (2004). "Regulation of the Escherichia coli sigma-dependent envelope stress response." Mol Microbiol **52**(3): 613-9.
- Alberti, S., F. Rodriguez-Quinones, et al. (1995). "A porin from Klebsiella pneumoniae: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding." Infect Immun **63**(3): 903-10.
- Alton, G., Ed. (1977). Experience with Brucella vaccines. Bovine Brucellosis. College station, Texas T&M University Press.
- Alton, G. G., L. M. Jones, et al., Eds. (1988). Techniques for Brucellosis Laboratory. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson, et al. (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 215-37.
- Basle, A., G. Rummel, et al. (2006). "Crystal structure of osmoporin OmpC from E. coli at 2.0 Å." J Mol Biol **362**(5): 933-42.
- Bearden, S. "Unpublished data."
- Behrens, S., R. Maier, et al. (2001). "The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity." EMBO J **20**(1-2): 285-94.
- Beveridge, T. J. (1999). "Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles." J Bacteriol **181**(16): 4725-33.
- Beveridge, T. J., S. A. Makin, et al. (1997). "Interactions between biofilms and the environment." FEMS Microbiol Rev **20**(3-4): 291-303.
- Blot, S., P. Depuydt, et al. (2007). "Measuring the impact of multidrug resistance in nosocomial infection." Curr Opin Infect Dis **20**(4): 391-6.
- Boigegrain, R. A., I. Salhi, et al. (2004). "Release of periplasmic proteins of Brucella suis upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25." Infect Immun **72**(10): 5693-703.
- Bolla, J. M., N. Saint, et al. (2004). "Crystallization and preliminary crystallographic studies of MOMP (major outer membrane protein) from Campylobacter jejuni." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 2): 2349-51.
- Bos, M. P., V. Robert, et al. (2007). "Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane." Annu Rev Microbiol **61**: 191-214.
- Bruce, D. (1887). "Note on the discovery of a microorganism in Malta fever." Practitioner **39**: 161-170.
- Bryskier, A., Ed. (2005). Antimicrobials agents: Antibacterials and Antifungals. Washington, ASM Press.
- Caro-Hernandez, P., L. Fernandez-Lago, et al. (2007). "Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of Brucella ovis." Infect Immun **75**(8): 4050-61.
- Carroll, J. A., S. A. Coleman, et al. (2000). "Hemin-binding surface protein from Bartonella quintana." Infect Immun **68**(12): 6750-7.
- Charbit, A., J. C. Boulain, et al. (1986). "Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface." EMBO J **5**(11): 3029-37.
- Chatterjee, S. N. and J. Das (1967). "Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by Vibrio cholerae." J Gen Microbiol **49**(1): 1-11.
- Chen, R. and U. Henning (1996). "A periplasmic protein (Skp) of Escherichia coli selectively binds a class of outer membrane proteins." Mol Microbiol **19**(6): 1287-94.
- Ciofu, O., T. J. Beveridge, et al. (2000). "Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from Pseudomonas aeruginosa." J Antimicrob Chemother **45**(1): 9-13.
- Cloekaert, A., P. de Wergifosse, et al. (1990). "Identification of seven surface-exposed Brucella outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay." Infect Immun **58**(12): 3980-7.
- Cloekaert, A., I. Jacques, et al. (1992). "Protection against Brucella melitensis or Brucella abortus in mice with immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM monoclonal antibodies specific for a common epitope shared by the Brucella A and M smooth lipopolysaccharides." Infect Immun **60**(1): 312-5.

- Cloeckaert, A., I. Jacques, et al. (1995). "Immunogenic properties of *Brucella melitensis* cell-wall fractions in BALB/c mice." *J Med Microbiol* **42**(3): 200-8.
- Cloeckaert, A., J. M. Verger, et al. (1995). "Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*." *Microbiology* **141** (Pt 9): 2111-21.
- Cloeckaert, A., J. M. Verger, et al. (1996). "Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*." *FEMS Microbiol Lett* **145**(1): 1-8.
- Cloeckaert, A., N. Vizcaino, et al. (2002). "Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future." *Vet Microbiol* **90**(1-4): 229-47.
- De Cock, H., U. Schafer, et al. (1999). "Affinity of the periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* for phospholipids, lipopolysaccharides and non-native outer membrane proteins. Role of Skp in the biogenesis of outer membrane protein." *Eur J Biochem* **259**(1-2): 96-103.
- de Keyzer, J., C. van der Does, et al. (2003). "The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex." *Cell Mol Life Sci* **60**(10): 2034-52.
- de Wergifosse, P., P. Lintermans, et al. (1995). "Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*." *J Bacteriol* **177**(7): 1911-4.
- Delcour, A. H. (2003). "Solute uptake through general porins." *Front Biosci* **8**: d1055-71.
- Delpino, M. V., J. Cassataro, et al. (2006). "*Brucella* outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein." *Microbes Infect* **8**(5): 1203-8.
- Derrick, J. P., R. Urwin, et al. (1999). "Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins." *Infect Immun* **67**(5): 2406-13.
- Diederichs, K., J. Freigang, et al. (1998). "Prediction by a neural network of outer membrane beta-strand protein topology." *Protein Sci* **7**(11): 2413-20.
- Dorward, D. W., C. F. Garon, et al. (1989). "Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*." *J Bacteriol* **171**(5): 2499-505.
- Douglas, J. T., E. Y. Rosenberg, et al. (1984). "Porins of *Brucella* species." *Infect Immun* **44**(1): 16-21.
- Dubray, G. (1981). PhD Thesis. Paris, Université de Paris-Sud.
- Dubray, G. (1987). "Protective antigens in brucellosis." *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**(1): 84-7.
- Dubray, G. and G. Bezard (1980). "Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis." *Ann Rech Vet* **11**(4): 367-73.
- Dubray, G. and C. Charriaut (1983). "Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane." *Ann Rech Vet* **14**(3): 311-8.
- Edmonds, M. D., A. Cloeckaert, et al. (2001). "Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle." *Am J Vet Res* **62**(9): 1461-6.
- Edmonds, M. D., A. Cloeckaert, et al. (2002). "*Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*." *Vet Microbiol* **88**(3): 205-21.
- Edmonds, M. D., A. Cloeckaert, et al. (2002). "Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Deltaomp25 deletion mutant." *Res Vet Sci* **72**(3): 235-9.
- Elzer, P. H., R. H. Jacobson, et al. (1994). "Antibody-mediated protection against *Brucella abortus* in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19." *Immunology* **82**(4): 651-8.
- Enright, F. M., Ed. (1990). *Animal Brucellosis*. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. Antigens of *Brucella*. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Ficht, T. A., S. W. Bearden, et al. (1988). "A 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA." *Infect Immun* **56**(8): 2036-46.
- Ficht, T. A., S. W. Bearden, et al. (1989). "DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*." *Infect Immun* **57**(11): 3281-91.
- Ficht, T. A., S. W. Bearden, et al. (1990). "Genetic variation at the *omp2* porin locus of the *brucellae*: species-specific markers." *Mol Microbiol* **4**(7): 1135-42.
- Ficht, T. A., H. S. Hussein, et al. (1996). "Species-specific sequences at the *omp2* locus of *Brucella* type strains." *Int J Syst Bacteriol* **46**(1): 329-31.
- Figuerola-Bossi, N., S. Lemire, et al. (2006). "Loss of Hfq activates the sigmaE-dependent envelope stress response in *Salmonella enterica*." *Mol Microbiol* **62**(3): 838-52.
- Freer, E., N. Rojas, et al. (1995). "Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides." *Res Microbiol* **146**(7): 569-78.

- Freudl, R., H. Schwarz, et al. (1986). "An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* K-12 undergoes a conformational change during export." J Biol Chem **261**(24): 11355-61.
- Galdiero, M., A. Folgore, et al. (1999). "Porins and lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella typhimurium* induce leucocyte transmigration through human endothelial cells in vitro." Clin Exp Immunol **116**(3): 453-61.
- Gamazo, C. and I. Moriyon (1987). "Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells." Infect Immun **55**(3): 609-15.
- Gamazo, C., A. J. Winter, et al. (1989). "Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*." Infect Immun **57**(5): 1419-26.
- Garavito, R. M. and S. Ferguson-Miller (2001). "Detergents as tools in membrane biochemistry." J Biol Chem **276**(35): 32403-6.
- Garin-Bastuji, B., J. Hars, et al. (2000). "Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France." Epidémiol. et santé anim. **38**: 1-5.
- Genco, C. A. and D. W. Dixon (2001). "Emerging strategies in microbial haem capture." Mol Microbiol **39**(1): 1-11.
- Genevrois, S., L. Steeghs, et al. (2003). "The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane." Embo J **22**(8): 1780-9.
- Gomez-Miguel, M. J. and I. Moriyon (1986). "Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella* spp." Infect Immun **53**(3): 678-84.
- Gomez-Miguel, M. J., I. Moriyon, et al. (1987). "Brucella outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with *Escherichia coli* Braun lipoprotein and is exposed on the cell surface." Infect Immun **55**(1): 258-62.
- Gorvel, J. P. and E. Moreno (2002). "Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication." Vet Microbiol **90**(1-4): 281-97.
- Guzman-Verri, C., E. Chaves-Olarte, et al. (2001). "GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42." J Biol Chem **276**(48): 44435-43.
- Guzman-Verri, C., L. Manterola, et al. (2002). "The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12375-80.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, et al. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." Nat Rev Microbiol **2**(2): 95-108.
- Harris, B. Z. and W. A. Lim (2001). "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." J Cell Sci **114**(Pt 18): 3219-31.
- Hayashi, S. and H. C. Wu (1990). "Lipoproteins in bacteria." J Bioenerg Biomembr **22**(3): 451-71.
- Hennecke, G., J. Nolte, et al. (2005). "The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition." J Biol Chem **280**(25): 23540-8.
- Ho, D. N., N. C. Pomroy, et al. (2008). "Crystal structure of a self-assembling lipopeptide detergent at 1.20 Å." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 12861-6.
- Hoekstra, D., J. W. van der Laan, et al. (1976). "Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **455**(3): 889-99.
- Hubbard, T., J. Park, et al. (1996). "Protein structure prediction: playing the fold." Trends Biochem Sci **21**(8): 279-81.
- Hunte, C., G. v. Jagow, et al., Eds. (2003). Membrane protein purification and crystallization: a practical guide, Academic Press (Elsevier Science).
- Iwanczyk, J., D. Damjanovic, et al. (2007). "Role of the PDZ domains in *Escherichia coli* DegP protein." J Bacteriol **189**(8): 3176-86.
- Jahans, K. L., G. Foster, et al. (1997). "The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals." Vet Microbiol **57**(4): 373-82.
- Jahnig, F. (1990). "Structure predictions of membrane proteins are not that bad." Trends Biochem Sci **15**(3): 93-5.
- Jap, B. K. and P. J. Walian (1996). "Structure and functional mechanism of porins." Physiol Rev **76**(4): 1073-88.
- Johansen, J., A. A. Rasmussen, et al. (2006). "Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins." J Mol Biol **364**(1): 1-8.

- Jubier-Maurin, V., R. A. Boigegrain, et al. (2001). "Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages." *Infect Immun* **69**(8): 4823-30.
- Kadurugamuwa, J. L. and T. J. Beveridge (1995). "Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion." *J Bacteriol* **177**(14): 3998-4008.
- Kadurugamuwa, J. L. and T. J. Beveridge (1996). "Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics." *J Bacteriol* **178**(10): 2767-74.
- Kadurugamuwa, J. L. and T. J. Beveridge (1997). "Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release." *J Antimicrob Chemother* **40**(5): 615-21.
- Kadurugamuwa, J. L. and T. J. Beveridge (1999). "Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria." *Microbiology* **145** (Pt 8): 2051-60.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, et al. (2000). "Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*." *DNA Res* **7**(6): 331-8.
- Koebnik, R., K. P. Locher, et al. (2000). "Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell." *Mol Microbiol* **37**(2): 239-53.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, et al. (2007). "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." *Cell* **130**(5): 797-810.
- Krojer, T., J. Sawa, et al. (2008). "Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP." *Nature* **453**(7197): 885-90.
- Kuehn, M. J. and N. C. Kestly (2005). "Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction." *Genes Dev* **19**(22): 2645-55.
- Kumar, P. D. and S. Krishnaswamy (2005). "Overexpression, refolding, and purification of the major immunodominant outer membrane porin OmpC from *Salmonella typhi*: characterization of refolded OmpC." *Protein Expr Purif* **40**(1): 126-33.
- Kuo, W. T., K. H. Chin, et al. (2008). "Crystal structure of the C-terminal domain of a flagellar hook-capping protein from *Xanthomonas campestris*." *J Mol Biol* **381**(1): 189-99.
- Lazar, S. W. and R. Kolter (1996). "SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins." *J Bacteriol* **178**(6): 1770-3.
- Lee, P. A., D. Tullman-Ercek, et al. (2006). "The bacterial twin-arginine translocation pathway." *Annu Rev Microbiol* **60**: 373-95.
- Li, Z., A. J. Clarke, et al. (1996). "A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles." *J Bacteriol* **178**(9): 2479-88.
- Li, Z., A. J. Clarke, et al. (1998). "Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria." *J Bacteriol* **180**(20): 5478-83.
- Limet, J. N., N. Bosseray, et al. (1989). "Humoral immunity in mice mediated by monoclonal antibodies against the A and M antigens of *Brucella*." *J Med Microbiol* **30**(1): 37-43.
- Malinverni, J. C., J. Werner, et al. (2006). "YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **61**(1): 151-64.
- Manterola, L., C. Guzman-Verri, et al. (2007). "BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence." *Infect Immun* **75**(10): 4867-74.
- Manterola, L., I. Moriyon, et al. (2005). "The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides." *J Bacteriol* **187**(16): 5631-9.
- Marquis, H. and T. A. Ficht (1993). "The omp2 gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins." *Infect Immun* **61**(9): 3785-90.
- Marston, A. J. (1861). "Report on fever (Malta)." *Great Britain Army Med Dept Rep* **3**: 486.
- Martin-Martin, A. I., P. Caro-Hernandez, et al. (2008). "Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells." *Microbes Infect* **10**(6): 706-10.
- Mashburn-Warren, L., R. J. McLean, et al. (2008). "Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface." *Geobiology* **6**(3): 214-9.

- Mayrand, D. and D. Grenier (1989). "Biological activities of outer membrane vesicles." *Can J Microbiol* **35**(6): 607-13.
- Meltzer, M., S. Hasenbein, et al. (2008). "Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control." *Angew Chem Int Ed Engl* **47**(7): 1332-4.
- Meyer, K. F. and E. B. Shaw (1920). "Comparison of morphologic, cultural and biochemical characteristics of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Studies on genus *Brucella* Nov. Gen." *J Infect Dis* **27**: 173-184.
- Mobasheri, H., T. A. Ficht, et al. (1997). "Brucella Omp2a and Omp2b porins: single channel measurements and topology prediction." *FEMS Microbiol Lett* **155**(1): 23-30.
- Montaraz, J. A., A. J. Winter, et al. (1986). "Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies." *Infect Immun* **51**(3): 961-3.
- Moreno, E., A. Cloeckaert, et al. (2002). "Brucella evolution and taxonomy." *Vet Microbiol* **90**(1-4): 209-27.
- Moreno, E. and I. Moriyon (2002). "Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 1-3.
- Moreno, E. and I. Moriyon, Eds. (2006). *The genus Brucella*. Prokaryotes.
- Newton, S. M., P. E. Klebba, et al. (1996). "Topology of the membrane protein LamB by epitope tagging and a comparison with the X-ray model." *J Bacteriol* **178**(12): 3447-56.
- Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4): 593-656.
- O'Callaghan, D., C. Cazevielle, et al. (1999). "A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*." *Mol Microbiol* **33**(6): 1210-20.
- Pages, J. M., C. E. James, et al. (2008). "The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria." *Nat Rev Microbiol* **6**(12): 893-903.
- Papenfort, K., V. Pfeiffer, et al. (2006). "SigmaE-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay." *Mol Microbiol* **62**(6): 1674-88.
- Paquet, J.-Y. (2000). Caractérisation structurale et fonctionnelle des porines Omp2a et Omp2b de *Brucella*. *Département de Biologie*. Namur, FUNDP.
- Paquet, J. Y., M. A. Diaz, et al. (2001). "Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp." *J Bacteriol* **183**(16): 4839-47.
- Paquet, J. Y., C. Vinals, et al. (2000). "Topology prediction of *Brucella abortus* Omp2b and Omp2a porins after critical assessment of transmembrane beta strands prediction by several secondary structure prediction methods." *J Biomol Struct Dyn* **17**(4): 747-57.
- Pautsch, A., J. Vogt, et al. (1999). "Strategy for membrane protein crystallization exemplified with OmpA and OmpX." *Proteins* **34**(2): 167-72.
- Phillips, M., B. L. Deyoe, et al. (1989). "Protection of mice against *Brucella abortus* infection by inoculation with monoclonal antibodies recognizing *Brucella* O-antigen." *Am J Vet Res* **50**(12): 2158-61.
- Porte, F., A. Naroeni, et al. (2003). "Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages." *Infect Immun* **71**(3): 1481-90.
- Prive, G. G. (2007). "Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins." *Methods* **41**(4): 388-97.
- Qu, J., C. Mayer, et al. (2007). "The trimeric periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane proteins via hydrophobic and electrostatic interactions." *J Mol Biol* **374**(1): 91-105.
- Rice, L. B. (2007). "Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria." *Cleve Clin J Med* **74 Suppl 4**: S12-20.
- Rizzitello, A. E., J. R. Harper, et al. (2001). "Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **183**(23): 6794-800.
- Robert, V., E. B. Volokhina, et al. (2006). "Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif." *PLoS Biol* **4**(11): e377.
- Rouviere, P. E. and C. A. Gross (1996). "SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins." *Genes Dev* **10**(24): 3170-82.
- Ruckdeschel, K., S. Harb, et al. (1998). "*Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production." *J Exp Med* **187**(7): 1069-79.

- Ruckdeschel, K., J. Machold, et al. (1997). "Yersinia enterocolitica promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production." J Biol Chem **272**(25): 15920-7.
- Salhi, I., R. A. Boigegrain, et al. (2003). "Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of Brucella spp." Infect Immun **71**(8): 4326-32.
- Santos, J. M., D. R. Verstrete, et al. (1984). "Outer membrane proteins from rough strains of four Brucella species." Infect Immun **46**(1): 188-94.
- Schirmer, T. and S. W. Cowan (1993). "Prediction of membrane-spanning beta-strands and its application to maltoporin." Protein Sci **2**(8): 1361-3.
- Schooling, S. R. and T. J. Beveridge (2006). "Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms." J Bacteriol **188**(16): 5945-57.
- Schulz, G. E. (2002). "The structure of bacterial outer membrane proteins." Biochim Biophys Acta **1565**(2): 308-17.
- Schweizer, M., I. Hindennach, et al. (1978). "Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. Interaction of protein II with lipopolysaccharide." Eur J Biochem **82**(1): 211-7.
- Sklar, J. G., T. Wu, et al. (2007). "Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6400-5.
- Sklar, J. G., T. Wu, et al. (2007). "Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*." Genes Dev **21**(19): 2473-84.
- Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerda, et al. (1998). "A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence." Mol Microbiol **29**(1): 125-38.
- Spiess, C., A. Beil, et al. (1999). "A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein." Cell **97**(3): 339-47.
- Spink, W. W., Ed. (1956). The Nature of Brucellosis. Minneapolis, MN, University of Minnesota Press.
- Taylor, R., J. W. Burgner, et al. (1998). "Purification and characterization of monomeric *Escherichia coli* vitamin B12 receptor with high affinity for colicin E3." J Biol Chem **273**(47): 31113-8.
- Tibor, A., B. Decelle, et al. (1999). "Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins." Infect Immun **67**(9): 4960-2.
- Tibor, A., E. Saman, et al. (1996). "Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*." Infect Immun **64**(1): 100-7.
- Tibor, A., V. Wansard, et al. (2002). "Effect of omp10 or omp19 deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice." Infect Immun **70**(10): 5540-6.
- Tibor, A., V. Weynants, et al. (1994). "Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to pal lipoproteins." Infect Immun **62**(9): 3633-9.
- Uzureau, S., M. Godefroid, et al. (2007). "Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*." J Bacteriol **189**(16): 6035-47.
- Van Nhieu, G. T. and P. J. Sansonetti, Eds. (2000). Cell adhesion and bacterial pathogens. Washington DC, Cellular Microbiology. American Society for Microbiology.
- Verger, J.-M., F. Grimont, et al. (1985). "*Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization." Int. J. Syst. Bacteriol. **35**: 292-295.
- Vizcaino, N., P. Caro-Hernandez, et al. (2004). "DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide." Microbes Infect **6**(9): 821-34.
- Vizcaino, N., A. Cloeckert, et al. (1996). "Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein." Infect Immun **64**(9): 3744-51.
- Vizcaino, N., A. Cloeckert, et al. (2001). "Characterization of a *Brucella* species 25-kilobase DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide." Infect Immun **69**(11): 6738-48.

- Vizcaino, N. and L. Fernandez-Lago (1994). "Protection and suppression of the humoral immune response in mice mediated by a monoclonal antibody against the M epitope of Brucella." FEMS Immunol Med Microbiol **8**(2): 133-9.
- Vizcaino, N., R. Kittelberger, et al. (2001). "Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of Brucella ovis result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other Brucella species." Infect Immun **69**(11): 7020-8.
- von Heijne, G. and C. Manoil (1990). "Membrane proteins: from sequence to structure." Protein Eng **4**(2): 109-12.
- Voulhoux, R., M. P. Bos, et al. (2003). "Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly." Science **299**(5604): 262-5.
- Voulhoux, R. and J. Tommassen (2004). "Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly." Res Microbiol **155**(3): 129-35.
- Walsh, N. P., B. M. Alba, et al. (2003). "OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain." Cell **113**(1): 61-71.
- Werner, J. and R. Misra (2005). "YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and lipid-independent outer membrane proteins of Escherichia coli." Mol Microbiol **57**(5): 1450-9.
- Winter, A. J., J. R. Duncan, et al. (1989). "Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of Brucella abortus infection in mice." Infect Immun **57**(11): 3438-44.
- Wu, T., J. Malinverni, et al. (2005). "Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in Escherichia coli." Cell **121**(2): 235-45.
- Young, E. J. (1983). "Human brucellosis." Rev Infect Dis **5**(5): 821-42.
- Zhang, H. H., D. R. Blanco, et al. (1999). "Renaturation of recombinant Treponema pallidum rare outer membrane protein 1 into a trimeric, hydrophobic, and porin-active conformation." J Bacteriol **181**(23): 7168-75.

Les *Brucella* – Espèces et biovars

ESPECE	Biovars	Hôte préférentiel	Zone géographique principale	Pathogénicité pour l'Homme
<i>B. melitensis</i>	1, 2, 3	Ovins, Caprins, Ongulés sauvages	Bassin méditerranéen	Forte
<i>B. abortus</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9	Bovins, Ongulés sauvages	Europe, Amérique, Afrique	Modérée
<i>B. suis</i>	1	Suidés	Amérique latine, Asie, Océanie, Espagne	Forte
	2	Suidés, Lièvres	Europe centrale, France	Inconnue
	3	Suidés	Etats Unis, Chine, Espagne	Forte
	4	Rennes	Etats Unis, Canada, Russie	Modérée
	5	Rongeurs sauvages	Russie	Forte
<i>B. neotomae</i>		Néotomes (<i>Neotoma lepida</i>)	Etats Unis	Inconnue
<i>B. ovis</i>		Ovins (mâles)	Bassin méditerranéen	Nulle
<i>B. canis</i>		Chiens	Etats Unis, Amérique du Sud, Europe	Faible

Figure 1. Table des espèces et biovars de *Brucella* avec leurs hôtes préférentiels, leur zone géographique et leur pathogénicité respective pour l'homme (Garin-Bastuji, Hars et al. 2000).

Species and biovar specific molecular markers in *Brucella* outer membrane protein genes

Species	Biovar	Target genes (restriction site) for differentiation at the level of Species	Biovar	Reference
Classical				
<i>B. melitensis</i>	Biovar 1, 2, 3	<i>omp25</i> (EcoRV)	n.d. ^a	(Cloekaert et al., 1995)
<i>B. abortus</i>	Biovar 1, 2, 4	$\Delta omp31$	<i>omp2a</i> ($\Delta 120$ bp)	(Cloekaert et al., 1995; Vizcaíno et al., 1997; Vizcaíno et al., 1999; Vizcaíno et al., 2001)
	Biovar 3, 5, 6, 9		n.d. ^a	(Vizcaíno et al., 1997; Vizcaíno et al., 1999; Vizcaíno et al., 2001)
<i>B. suis</i>	Biovar 1, 3, 4, 5	n.d. ^a	<i>omp2a/omp2b</i> ^b	(Cloekaert et al., 1995)
	Biovar 2		<i>omp31</i> (AvaII)	(Vizcaíno et al., 1997)
<i>B. ovis</i>		<i>omp25</i> ($\Delta 36$ bp); <i>omp31</i> (Sau3AI); <i>omp2b</i> (EcoRI or PvuII)	n.a. ^c	(Cloekaert et al., 1995; Vizcaíno et al., 1997)
<i>B. canis</i>		<i>omp31</i> (AvaII)	n.a. ^c	(Vizcaíno et al., 1997)
<i>B. neotomae</i>		<i>omp2a</i> (AluI); <i>omp2b</i> (HaeIII)	n.a. ^c	(Cloekaert et al., 1995)
Proposed for marine mammals ^d				
<i>B. pinnipediae</i>		<i>omp2b</i> (SfiI)	?	(Cloekaert et al., 2001)
<i>B. cetaceae</i>		<i>omp2a</i> (AluI or BglII or ClaI or EcoRI)	?	(Cloekaert et al., 2001)

^a n.d., not described.

^b Differentiation can be achieved by analysis of *omp2a/omp2b* with a combination of restriction enzymes (Cloekaert et al., 1995).

^c n.a., not applicable (there are no biovars in the species).

^d The proposal follows both the host range criterion and the demonstration of species specific markers.

Figure 2. Table reprenant les marqueurs moléculaires espèces et biovars spécifiques des gènes d'OMPs de *Brucella* (Moreno, Cloekaert et al. 2002). Pour cinq des six espèces principales ainsi que pour certaines souches marines, les gènes d'OMPs de *Brucella* constituent des marqueurs moléculaires spécifiques.

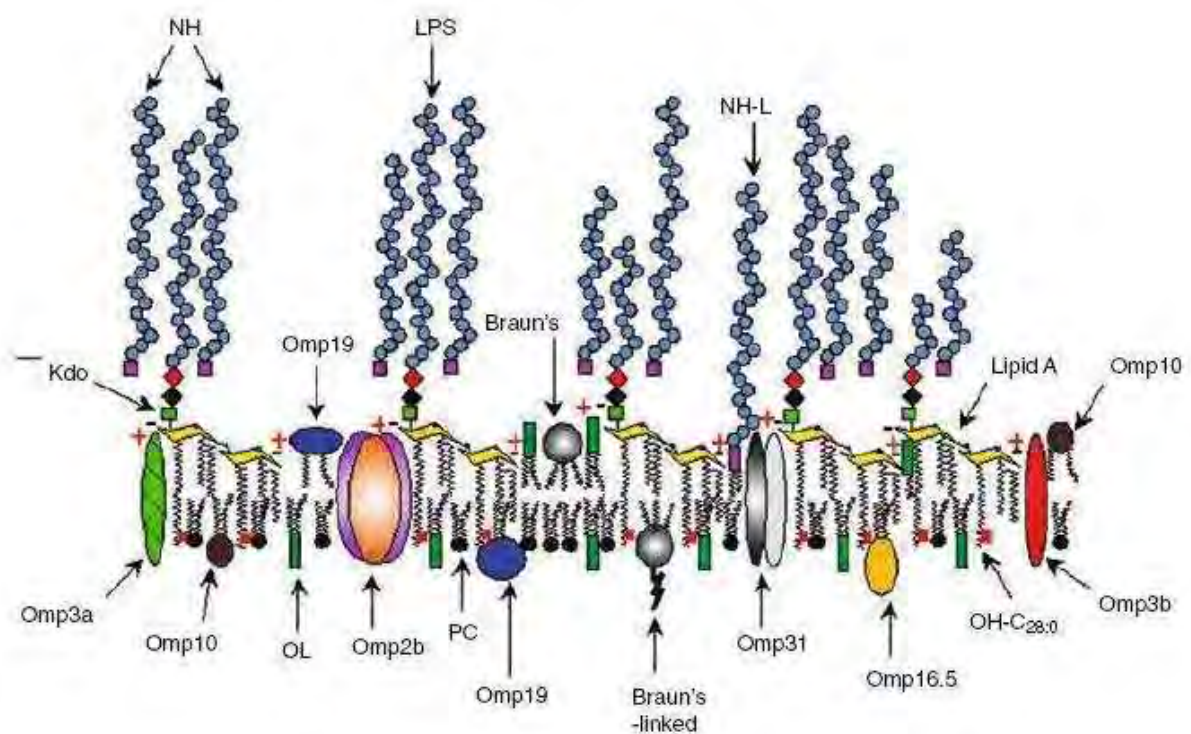


Figure 3. Modèle hypothétique de la membrane externe de *Brucella*. Les OMPs sont indiqués par le poids en kDa (par exemple l'Omp19) excepté pour deux protéines du groupe 3, l'Omp3a de 26 kDa et l'Omp3b de 23 kDa, et pour une protéine du groupe 2, l'Omp2b de 36 kDa. Les lipides A sont représentés par des trapézoïdes jaunes et sont liés aux acides gras représentés par des zigzags noirs. Le losange rouge représente l'extrémité hydroxyle de la chaîne acyl du LPS. Les carrés violet correspondent à des extrémités réduites NH d'un sucre inconnu pouvant être lié à un lipide (NH-L). Les lipoprotéines Braun peuvent être liées au peptidoglycane ou être libre dans la membrane externe. Les têtes polaires des lipides ornithines (OL) sont représentées par des rectangles verts. Les cercles noirs pleins correspondent aux phospholipides, principalement du phosphatidylcholine (PC). A noter que les extrémités NH peuvent être liées à la chaîne O de polysaccharides formant une couche dense. Les charges négatives du LPS sont neutralisées par les charges positives des lipides ornithines (OL) et des OMPs cationiques telles qu'Omp3b. Les OMPs du groupe 3 (Omp3a ou Omp25, Omp3b et Omp31) sont fortement liées au LPS. L'Omp2b est une porine (Moreno and Moriyon 2006).

A



B

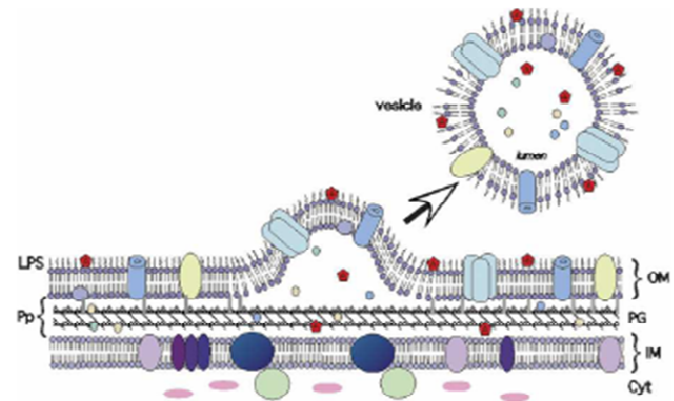


Figure 4. Formation d'OMVs à partir de la membrane externe de bactérie à Gram-négatif. (A) Coupe dans une bactérie de souche *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 présentant la formation d'OMVs. La flèche montre une OMV en formation pour laquelle est visible la double couche de phospholipides et le périplasme dans la lumière. Le trait en bas à droite représente 250 nm (Beveridge 1999). (B) Modèle de biogenèse des OMVs. Ces dernières sont des protéo-liposomes composés de phospholipides, de LPS, d'une série d'OMPs et de protéines périplasmiques dans la lumière de l'OMV. Les protéines et lipides de la membrane interne ne se retrouvent pas dans les OMVs. Les OMVs semblent émerger de sites où les liaisons entre la membrane externe et le peptidoglycane sont moins fréquents. Les pentagones représentent des protéines adhérant à la surface externe des bactéries et également associées à la surface externe des OMVs. (LPS) Lipopolysaccharides; (Pp) Périplasme; (OM) Membrane externe; (PG) Peptidoglycane; (IM) Membrane interne; (Cyt) Cytosol. (Kuehn and Kesty 2005).

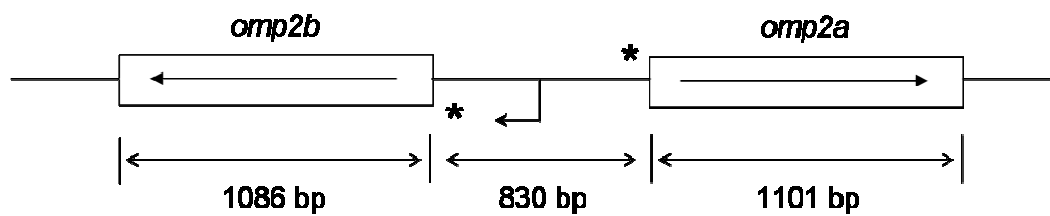


Figure 5. Carte du locus *omp2* chez *Brucella melitensis* 16M adaptée de la thèse de J.-Y. Paquet (Paquet 2000). Les séquences des gènes *omp2a* et *omp2b* sont représentées par les rectangles. Les étoiles correspondent aux RBS, soit, le site de liaison au ribosome. La flèche à angle droit indique le sens de la transcription.

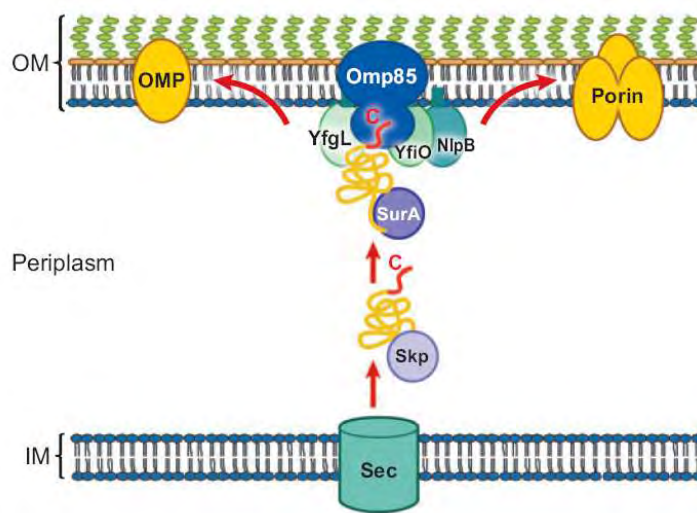


Figure 6. Modèle pour la biogenèse des OMPs. A la sortie du système Sec, l'OMP (représentée par un filament) est liée à la chaperonne Skp et ce complexe est amené jusqu'au complexe Omp85. Le motif en C-terminal de l'OMP est reconnu spécifiquement par les domaines périplasmiques de l'Omp85. D'autres chaperonnes telles que SurA peuvent interagir avec l'OMP. Après repliement, l'OMP est insérée en membrane. L'oligomérisation de certaines protéines telles que les porines, ne se réalise qu'après insertion en membrane. Les fonctions exactes des lipoprotéines YfgL, YfiO et NlpB ne sont pas connues. Une quatrième lipoprotéine récemment identifiée (Sklar, Wu et al. 2007), la SmpA n'est pas représentée ici. (Bos, Robert et al. 2007)

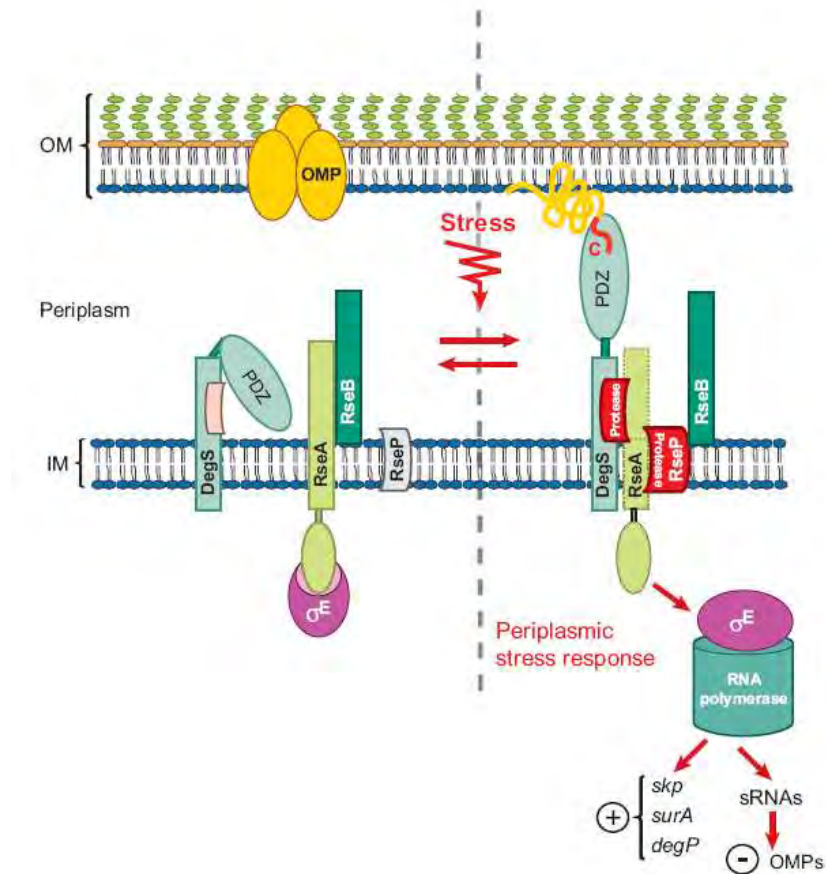


Figure 7. Réponse périplasmique au stress σ^E -dépendante. Lorsque des OMPs dénaturées s'accumulent dans le périplasme, une réponse de stress est enclenchée par la liaison entre le domaine C-terminal de l'OMP dénaturée et le domaine PDZ de DegS. Une cascade protéolytique s'initie libérant le facteur de transcription σ^E dans le cytoplasme. Ce facteur va dès lors pouvoir se lier à l'ARN polymérase et induire l'expression des gènes *skp*, *surA* et *degP* ainsi que l'expression de petits ARN réprimant l'expression d'OMPs. (Bos, Robert et al. 2007).

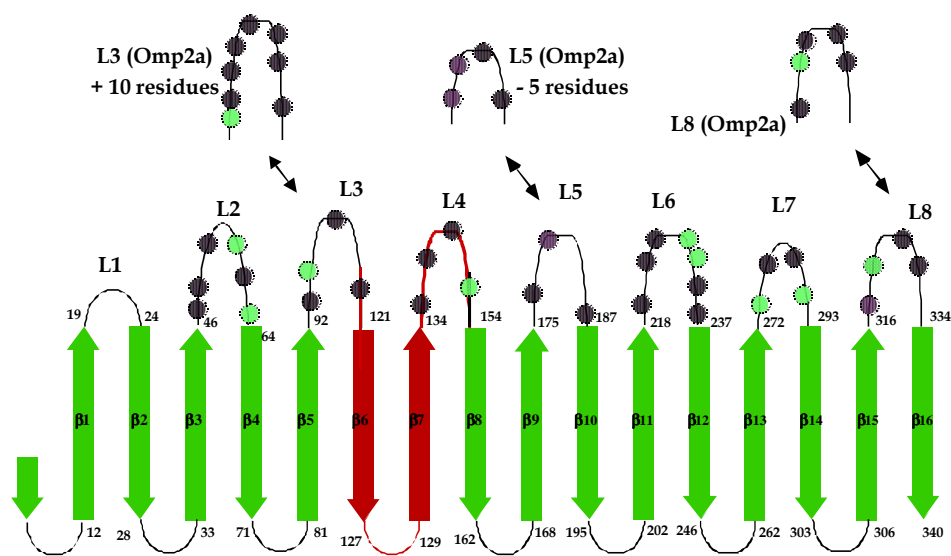
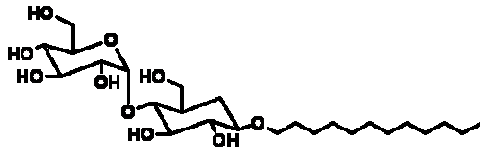


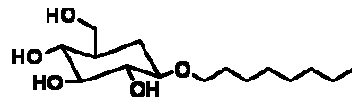
Figure 8. Modèle topologique pour Omp2b (et Omp2a) chez *B. abortus* et *B. melitensis*. Les brins β sont représentés par les flèches pleines. La numérotation (selon celle de la protéine mature) correspond au numéro des résidus situés aux extrémités de ces brins. Les positions relatives des résidus chargés au sein des boucles sont représentées par les boules foncées si le résidu est acide et claires si le résidu est basique. Les différences majeures entre l'Omp2a et l'Omp2b chez *B. melitensis* sont représentées dans la partie haute du schéma. En gris foncé, est représentée la région déléetée d'Omp2a chez *B. abortus*. Cette région comprend une partie de la boucle L3, les brins 6 et 7 ainsi qu'un segment de la boucle L4. (Paquet, Vinals et al. 2000)

Non ioniques



Dodecyl- β -D-maltoside (DDM)

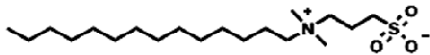
- CMC = ~ 0.12 mM
- Nbre agrégation = $\sim 78-149$
- Poids micellaire = 72 kDa



Octyl- β -glucoside (OG)

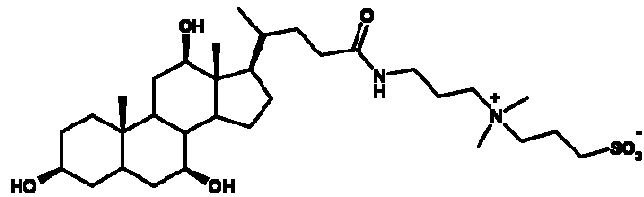
- CMC = ~ 23.4 mM
- Nbre agrégation = $\sim 27-100$
- Poids micellaire = ~ 8 kDa

Zwitterioniques



Anzergent 3-14

- CMC = ~ 0.2 mM
- Nbre agrégation = $\sim 83-130$
- Poids micellaire = ?



CHAPS

- CMC = ~ 8 mM
- Nbre agrégation = ~ 10
- Poids micellaire = $\sim 6,9$ kDa

Figure 9. Exemples de détergents utilisés avec les protéines membranaires intégrales. Cette figure reprend deux types de détergents, non ioniques et zwitterioniques, utilisés lors des renaturations de protéines membranaires. Les structures et données chiffrées sont issues des fiches "produits" d'Anatrace. CMC, concentration micellaire critique; Nbre, nombre; mM, millimolaire; kDa, kilodalton.

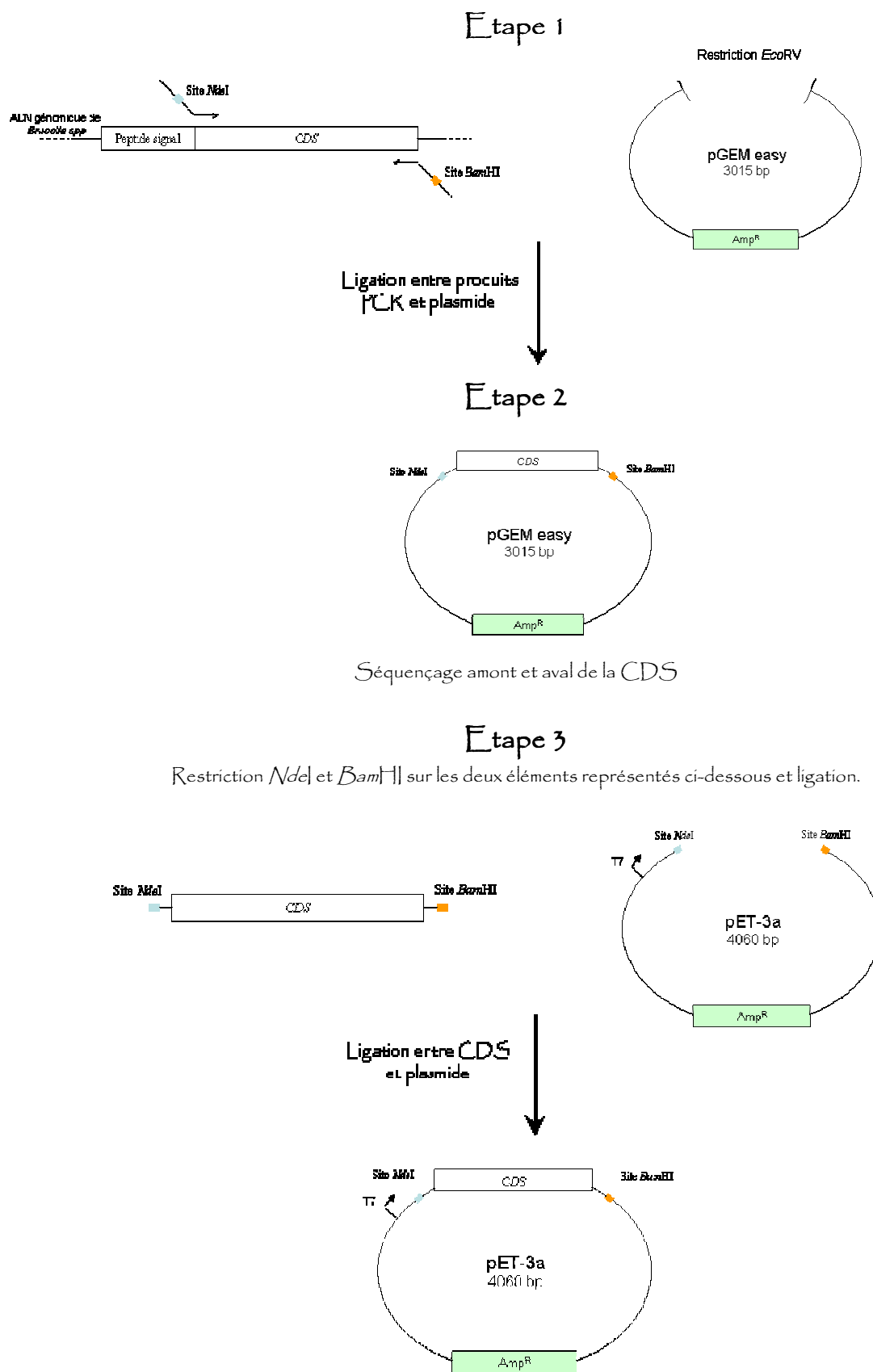


Figure 10. Étapes de construction des plasmides de surexpression. Concernant les Omp25 et Omp31, les étapes 1 & 2 ont été réalisées tandis que l'étape 3 reste à faire.

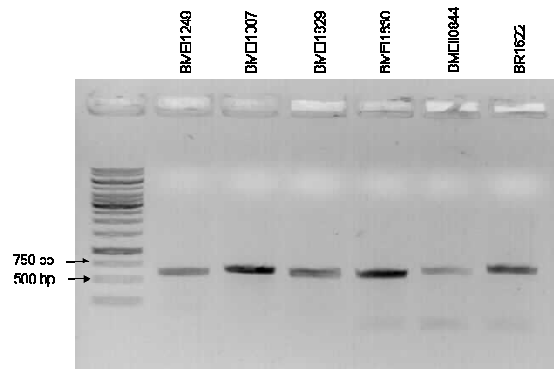


Figure 11. Gel d'agarose 1% des produits PCR purifiés des Omp25 et Omp31. Les produits PCR, purifiés sur colonne, ont été obtenus via l'utilisation de la *Phusion High-Fidelity* DNA polymérase. Les tailles attendues sont 584 bp, 656 bp, 636 bp, 638 bp, 677 bp, 716 bp respectivement pour les CDS suivantes: BMEI1249, BMEI1007, BMEI1829, BMEI1830, BMEI0844 et BR1622.

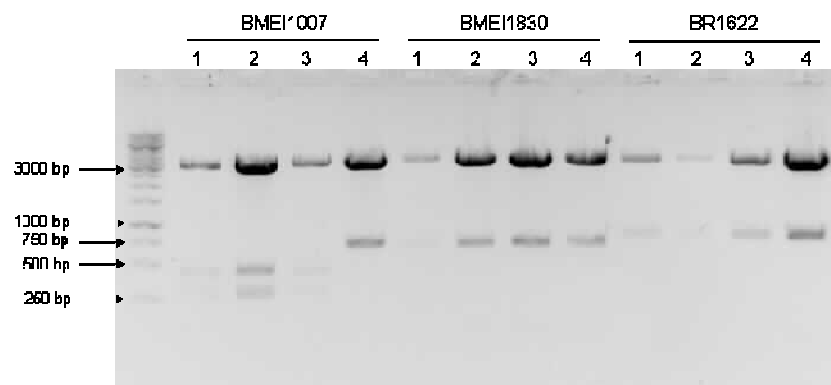


Figure 12. Gel d'agarose 1% des restrictions diagnostiques sur les ligations entre pGEM easy (restreint *EcoRV*) et les produits PCR des CDS BMEI1007, BMEI1830 et BR1622 après purification plasmidique des *E. coli* transformées. Les tailles attendues des fragments pour BMEI1007 restreint par *EcoRI* sont de 2997 bp, 411 bp et 263 bp ou de 2997 bp, 417 bp et 257 bp si l'insert se trouve dans l'autre direction. Pour BMEI1830 restreint par *Bam*HI et *Nde*I, les tailles attendues des fragments sont de 2981 bp, 630 bp et 42 bp quelque soit l'orientation de l'insert dans le pGEM easy. Enfin, la restriction de la ligation pGEM easy et BR1622 restreint par *EcoRI* a des tailles attendues de fragments de 2997 bp et 734 bp. Par contre dans le cas où le pGEM easy se serait refermé sur lui-même les tailles attendues pour une restriction par *EcoRI* sont de 2997 bp et 18 bp et, un fragment unique de 3015 bp pour une restriction par *Bam*HI et *Nde*I.

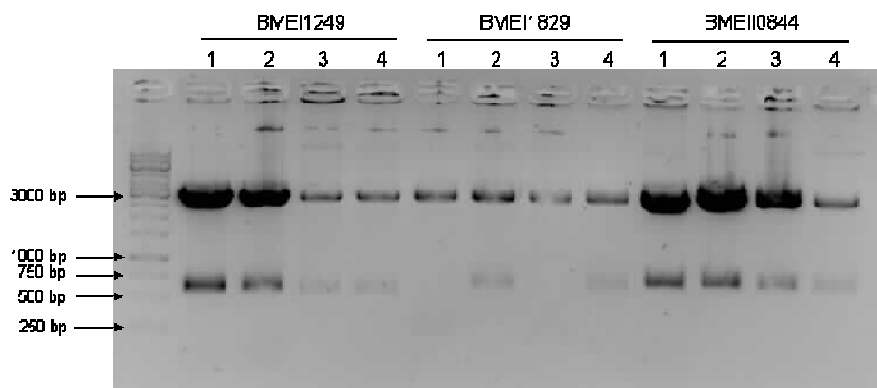


Figure 13. Gel d'agarose 1% des restrictions diagnostiques sur les ligations entre pGEM easy (restreint *EcoRV*) et les produits PCR des CDS BMEI1249, BMEI1829 et BMEI0844 après purification plasmidique des *E. coli* transformées. Les trois constructions sont restreintes par *EcoRI* et ont toutes un fragment attendu de 2997 bp et un second fragment de 602 bp, 654 bp et 695 bp respectivement pour BMEI1249, BMEI1829 et BMEI0844. Le pGEM easy seul restreint par *EcoRI* résulterait en deux fragments de 2997 bp et 18 bp.

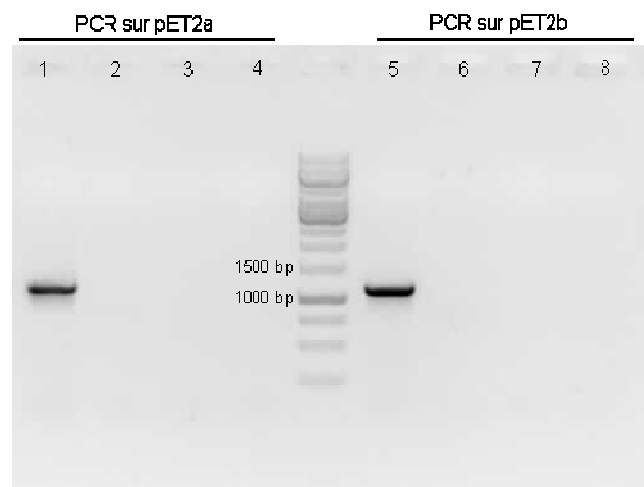


Figure 14. Gel d'agarose 1% des PCR diagnostiques sur les plasmides pET2a et pET2b. La partie gauche du gel concerne les PCR sur pET2a. La CDS *omp2a* est amplifié par les amorces 2aF et 2aR dans le puits 1. Le produit PCR a une taille attendue de 1148 bp. Les puits 2 à 4 sont des contrôles. Dans le puits 2, l'amorce 2aR est remplacée par 2bR. Les puits 3 et 4 sont des PCR contrôles négatifs, c'est-à-dire sans plasmide, exécutées avec les amorces 2aR + 2aF et 2bR + 2aF respectivement. La partie droite de la figure concerne les PCR sur pET2b. La CDS *omp2b* est amplifiée par les amorces 2bR et 2aF (puits 5) dont la taille attendue du produit est de 1132 bp. Les puits 6 à 8 correspondent aux mêmes contrôles que pour pET2a. Ainsi, dans le puits 6, l'amorce 2bR a été remplacée par 2aR. Les puits 7 et 8 correspondent aux contrôles négatifs réalisées respectivement avec les amorces 2bR + 2aF et 2aR + 2aF.

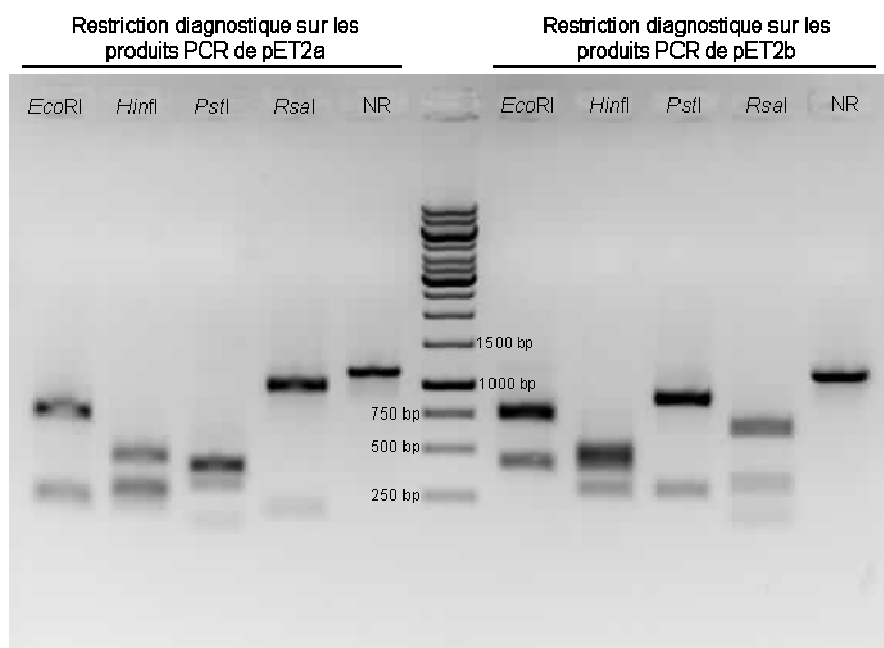


Figure 15. Gel d'agarose 1% des restrictions diagnostiques sur les produits PCR purifiés obtenus à partir de pET2a et pET2b. Concernant les restrictions sur la CDS *omp2a*, les tailles attendues des différents fragments sont les suivantes: 719 bp, 227 bp et 202 bp pour la restriction par *EcoRI*; 424 bp, 256 bp, 252 bp, 190 bp et 14 bp pour la restriction par *HinfI*; deux bandes à 375 bp, une à 281 bp et une dernière à 117 bp pour la restriction par *PstI*; 976 bp et 172 bp pour la restriction par *RsaI*. Dans le dernier puits concernant la CDS *omp2a*, le produit PCR est sous sa forme non restreinte (NR) dont la taille attendue est toujours de 1148 bp. La partie droite du gel concerne la CDS *omp2b*. Les tailles attendues des différents fragments sont les suivantes: 733 bp et 399 bp pour la restriction par *EcoRI*; 465 bp, 394 bp et 267 bp pour la restriction par *HinfI*; 852 bp et 280 bp pour la restriction par *PstI*; et, 647 bp, 313 bp et 172 bp pour la restriction par *RsaI*. A nouveau, le dernier puits pour *omp2b* correspond au produit PCR dont la taille attendue est de 1132 bp.

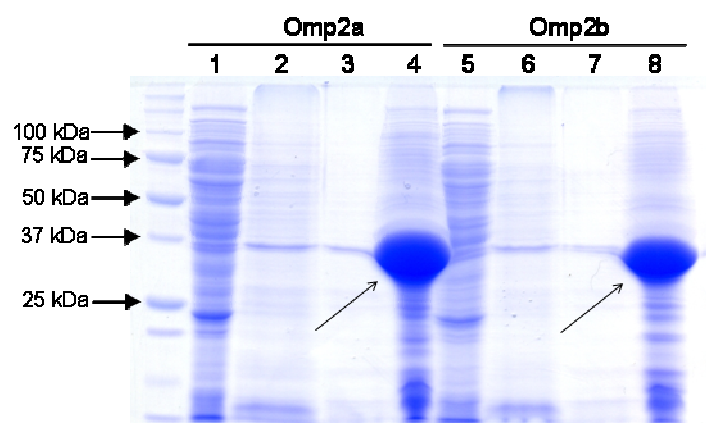


Figure 16. Gel SDS-PAGE des différentes fractions obtenues lors de la surproduction. Les puits 1 et 5 correspondent au dépôt de la fraction soluble de la lyse bactérienne. Les puits 2 et 3 ainsi que 6 et 7 correspondent respectivement pour Omp2a et Omp2b au surnageant du premier et second lavage des corps d'inclusion (cfr Matériels et méthodes). Enfin, dans les puits 4 et 8 ont migré les fractions des corps d'inclusion solubilisés dans le tampon TEN avec 8M urée. Les tailles attendues pour Omp2a et Omp2b sont d'environ 39,42 kDa et de 40,38 kDa respectivement.

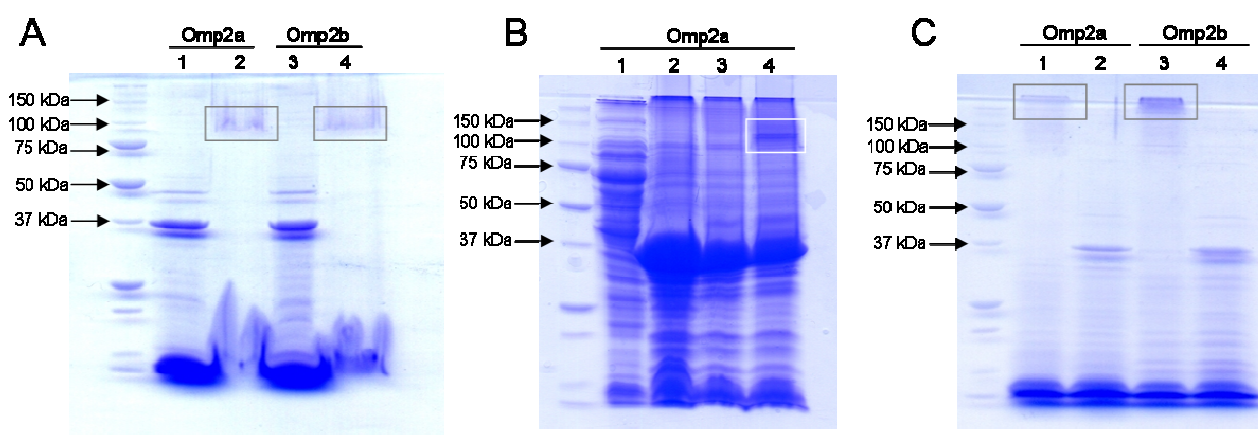


Figure 17. Gels SDS-PAGE des protéines renaturées au zwittergent 3-14 à A) 10%, B) 1% et C) 0,14%. Les tailles attendues pour les formes dénaturées sont d'environ 39,42 kDa et de 40,38 kDa respectivement pour Omp2a et Omp2b. En ce qui concerne les formes renaturées sous forme trimérique, les tailles attendues pour Omp2a et Omp2b sont d'environ 118,23 kDa et 121,14 kDa respectivement. (A) Ce premier gel montre les profils de migration des Omp2a et Omp2b dénaturées dans les puits 1 et 3 respectivement et de ces mêmes porines renaturées par dilution 1:1 dans du zwittergent 3-14 à 10% (dissout dans le tampon TEN) dans les puits 2 et 4 respectivement. (B) Ce second gel ne concerne que la renaturation d'Omp2a avec du zwittergent 3-14 à 1%. Dans le puits 1 a migré la fraction soluble obtenue lors de la lyse bactérienne. Le puits 2 présente le profil de migration des corps d'inclusion solubilisés. Enfin, respectivement dans les puits 3 et 4 ont migré Omp2a renaturée sans ou avec l'étape de sonication (cfr Matériels et méthodes). (C) Dans les puits 2 et 4 ont migrés les corps d'inclusion solubilisés contenant Omp2a et Omp2b. La migration de ces mêmes OMPs renaturées avec du zwittergent 3-14 de concentration 0,14% est visualisable dans les puits 1, pour Omp2a, et 3, pour Omp2b.

Remarque: les doubles bandes apparaissant sur les gels A et C sont dues à un artefact.

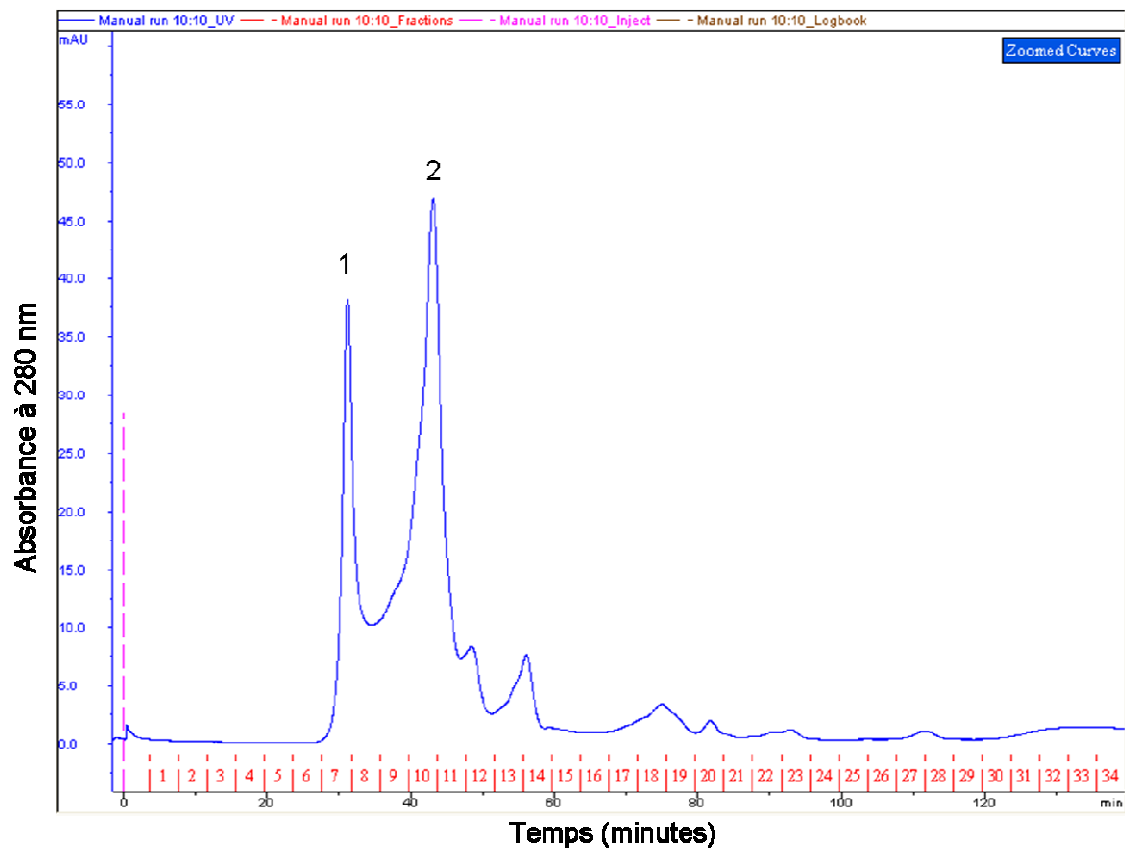


Figure 18. Chromatogramme d'exclusion de la purification d'Omp2a renaturée avec du zwittergent 3-14 à 1% sur une colonne Superdex 200. Ce chromatogramme représente les pics d'absorbance à 280 nm en fonction du temps et par conséquent, en fonction du volume d'élution. Le temps 0 correspond au moment où l'échantillon est injecté sur la colonne, représenté par les traits interrompus verticaux. Le pic 1 correspondrait à des protéines agrégées tandis que le pic 2 correspondrait aux trimères d'Omp2a. La numérotation indiquée sous le chromatogramme correspond au numéro des fractions collectées.

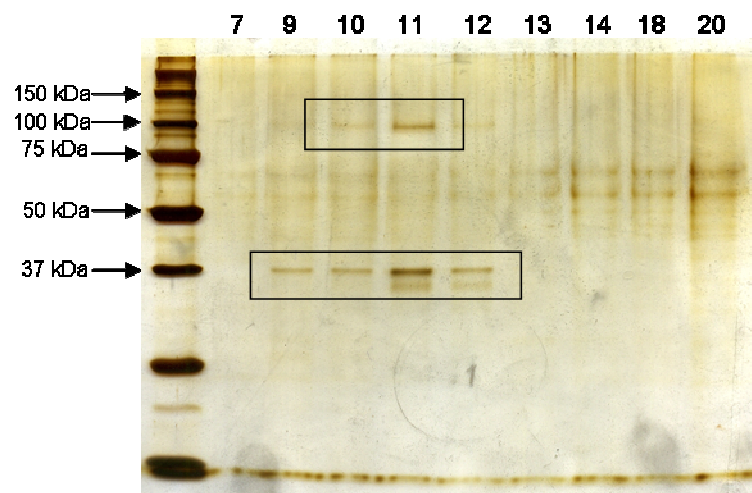


Figure 19. Gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent de différentes fractions obtenues après chromatographie d'exclusion d'Omp2a renaturée avec du zwittergent 3-14 1%. Les numéros annotés en haut de chaque piste de migration correspondent aux numéros des fractions de purification de la figure précédente. La piste 9 présente une bande de taille d'environ 37 kDa (flèche) alors qu'apparaît seulement dans le puits 10 une bande d'environ 100 kDa (seconde flèche). Les deux bandes entre 50 et 75 kDa sont un artéfact.

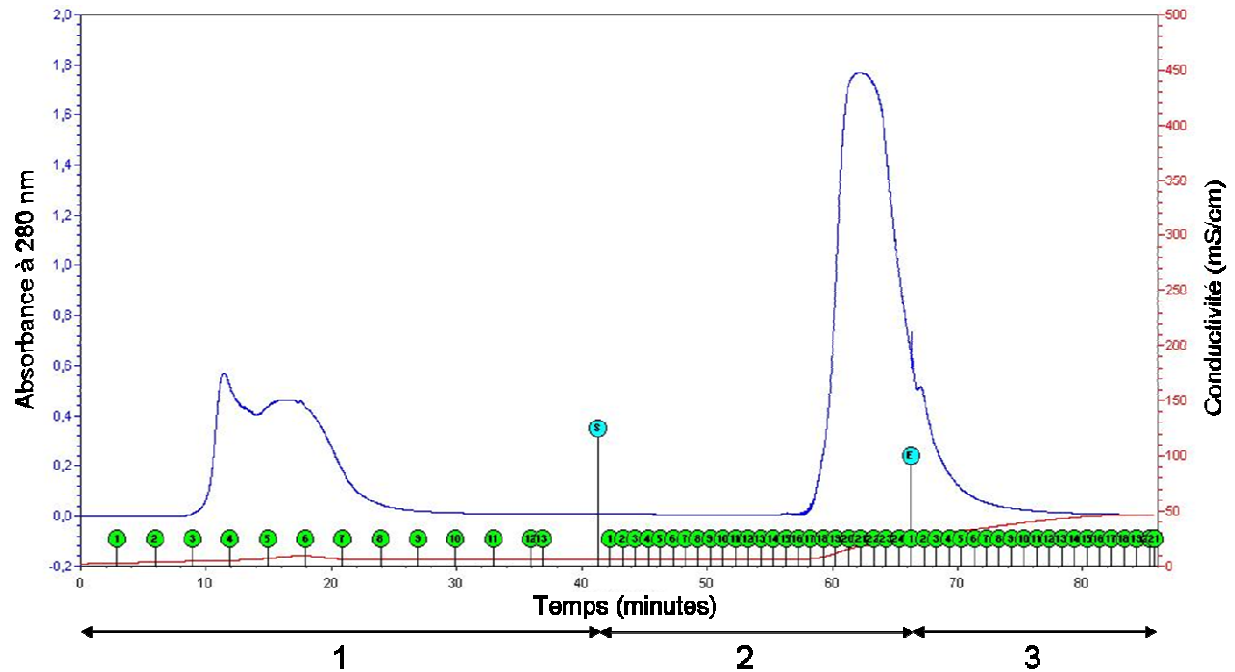


Figure 20. Chromatogramme de la purification sur colonne DEAE d'Omp2a à partir de corps d'inclusion solubilisés issus d'une culture de 200 ml. Le tracé du haut correspond à l'absorbance en protéines (à 280 nm) à la sortie de la colonne tandis que le tracé du bas correspond à la conductivité. La partie 1 du chromatogramme correspond à l'élimination du flow through grâce au tampon A (50mM Tris, 17mM NaCl, 8M urée et pH=8,0). La seconde partie correspond à l'élution d'Omp2a via l'application d'un gradient en NaCl allant de 0 à 100% de tampon B (50mM Tris, 500mM NaCl, 8M urée et pH=8,0) par rapport à la proportion de tampon A. La partie 3 du chromatogramme correspond au passage de 100% de tampon B afin d'éluer l'Omp2a restée accrochée à la résine.

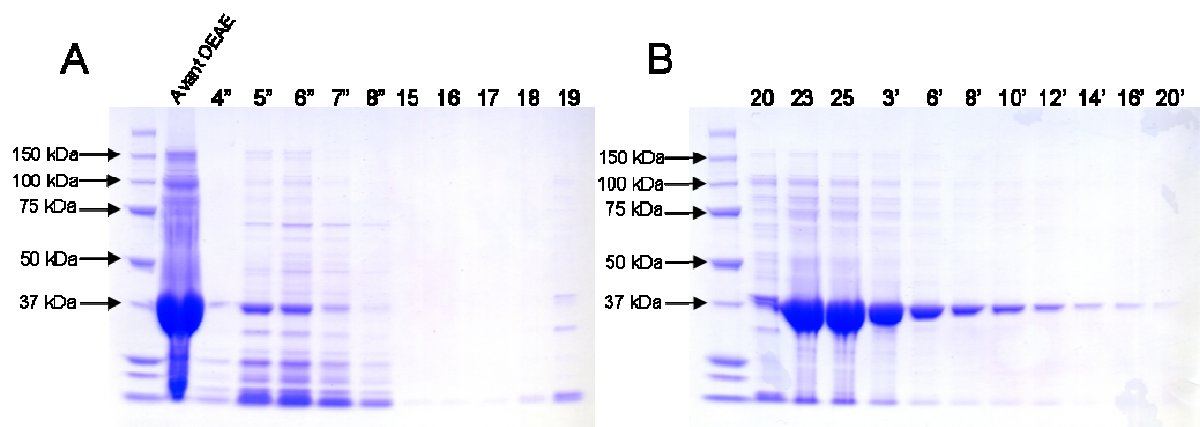


Figure 21. Gels SDS-PAGE des fractions de purification d'Omp2a sur DEAE. (A) Sur ce gel a été déposé une fraction des corps d'inclusions solubilisés représentée sur la figure par la dénomination "Avant DEAE". Le reste du gel comprend les premières fractions issues de la purification, la suite ayant été déposée sur le gel (B) Les fractions 4" à 8" correspondent à celles du flow through, les fractions 15 à 25 correspondent au gradient en NaCl et enfin, les fractions 3' à 20' sont relatives à l'élution avec 100% de tampon B (cfr Figure 20).

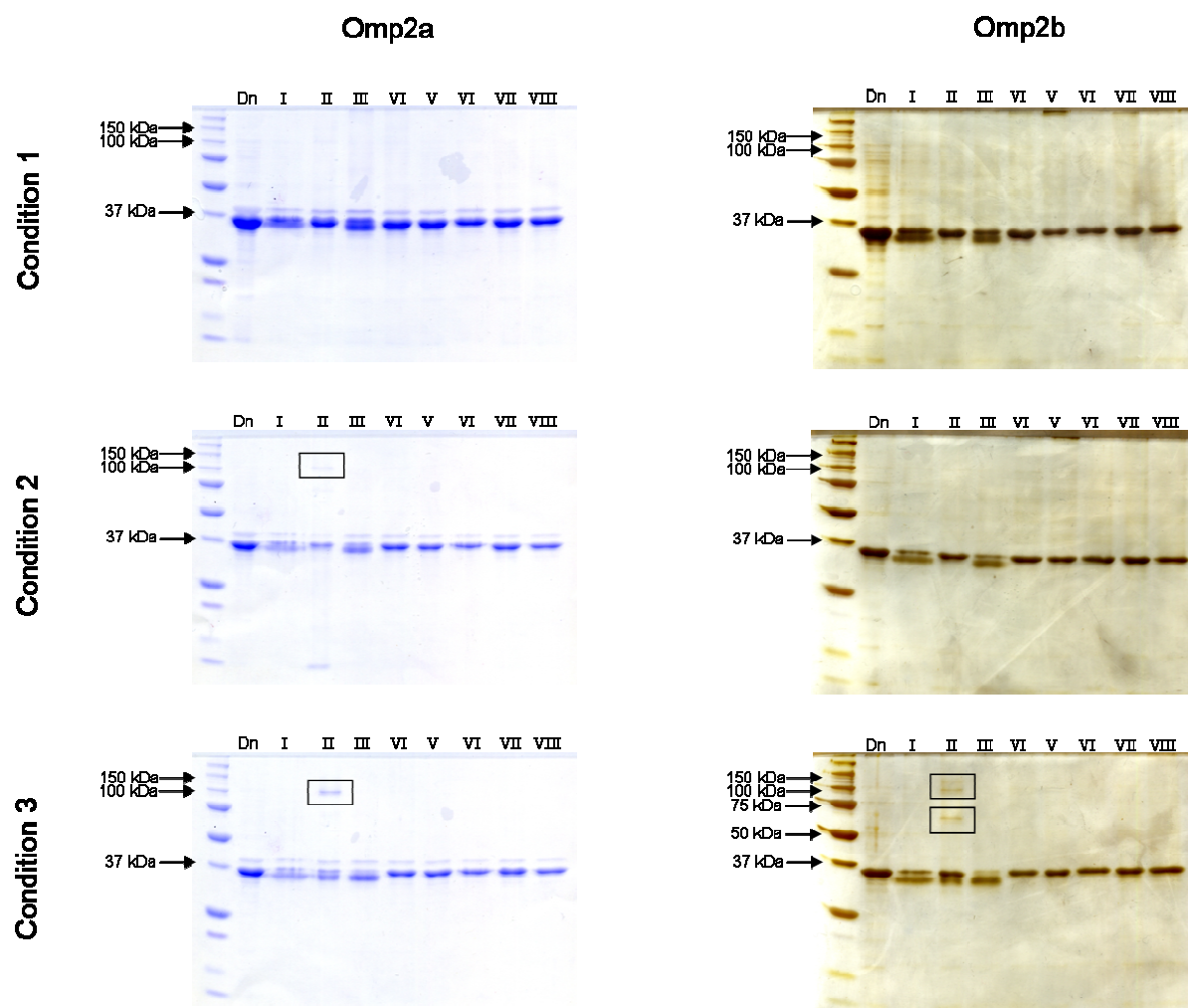


Figure 22. Essais de renaturation d'Omp2a et Omp2b en trois conditions jouant sur la concentration en urée et en protéine pour huit détergents. Pour chacun des gels, le premier puits (joutant celui de l'étalon protéique) est annoté "Dn". Cette abréviation signifie que ce puits contient la forme dénaturée et diluée le même nombre de fois que les formes renaturées des autres puits. Les annotations de I à VIII font référence aux numéros des détergents utilisés pour la renaturation (Table 1). Les gels de gauche, colorés au bleu de Coomassie, concernent les essais de renaturation sur Omp2a et ceux de droite, colorés au nitrate d'argent, concernent la renaturation d'Omp2b. Pour chacune de ces OMPs, les trois conditions testées (Table 2) sont mises en parallèle de haut en bas. La renaturation par le détergent II fait apparaître une bande d'environ 100 kDa aux conditions 2 et 3 pour Omp2a et à la condition 3 pour Omp2b où apparaît également une bande d'environ 60 kDa.

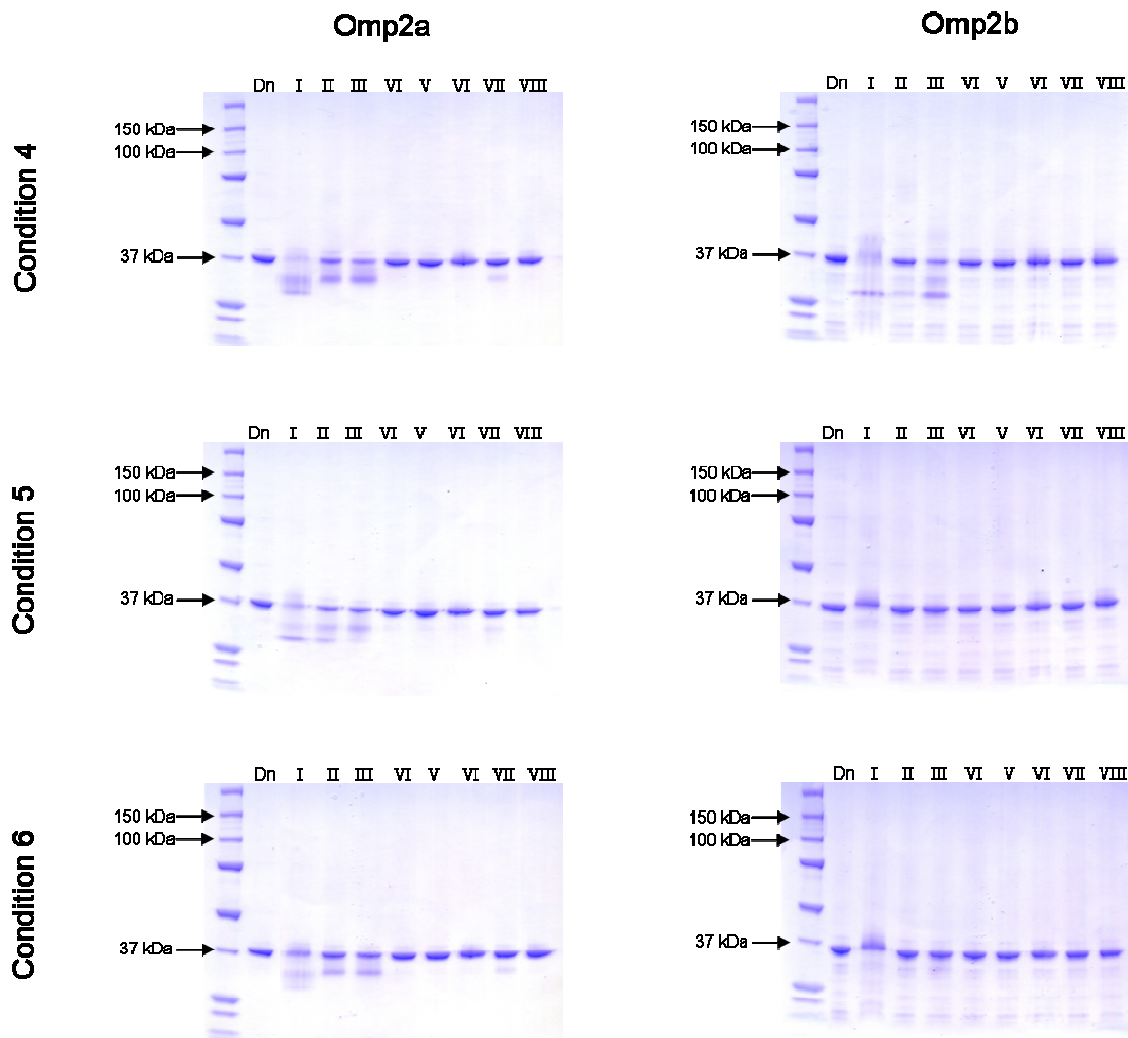


Figure 23. Essais de renaturation d'Omp2a et Omp2b en trois conditions à faible concentration en NaCl jouant sur la concentration en urée pour huit détergents (gels SDS-PAGE). Pour chacun des gels, colorés au bleu de Coomassie, le premier puits (joutant celui de l'étalon protéique) est annoté "Dn". Cette abréviation signifie que ce puits contient la forme dénaturée et diluée le même nombre de fois que les formes renaturées des autres puits. Les annotations de I à VIII font référence aux numéros des détergents utilisés pour la renaturation (Table 1). La partie gauche de la figure concerne la renaturation d'Omp2a tandis que la partie droite concerne celle d'Omp2b. Pour chacune de ces OMPs, trois conditions (Table 3) ont été testées et sont annotées de 4 à 6 à gauche des photographies de gels.

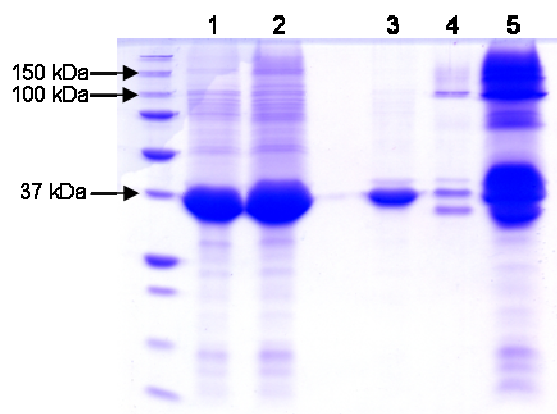


Figure 24. Concentration d'Omp2a avant ou après renaturation sur gel SDS-PAGE. Les puits 1 et 2 concernent la première stratégie (concentration puis renaturation). Dans le puits 1 se trouve Omp2a après concentration mais dénaturée. Dans le puits 2, Omp2a a été renaturée après concentration. Les puits 3 à 5 concernent la seconde stratégie (renaturation puis concentration). Dans le puits 3 a été déposée Omp2a dénaturée et non concentrée. Dans le puits 4 a migré Omp2a renaturée mais non concentrée. Et enfin, le dernier puits présente le profil de migration d'Omp2a renaturée puis concentrée.

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ◇	Tube #	Precipitant
1.	0.1 M Sodium chloride	1.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	1.	12% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
2.	0.1 M Zinc acetate dihydrate	2.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	2.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000
3.	0.2 M Ammonium sulfate	3.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	3.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
4.	0.1 M Sodium chloride	4.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	4.	12% v/v 2-Propanol
5.	None	5.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	5.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000
6.	None	6.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	6.	1.0 M Ammonium sulfate
7.	None	7.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	7.	1.0 M Magnesium sulfate heptahydrate
8.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	8.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	8.	18% v/v Polyethylene glycol 400
9.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	9.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	9.	1.0 M Ammonium phosphate monobasic
10.	0.1 M Sodium chloride	10.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	10.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
11.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	11.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	11.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
12.	0.1 M Sodium chloride	12.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	12.	18% v/v Polyethylene glycol 400
13.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	13.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	13.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000
14.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate	14.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	14.	10% v/v 2-Propanol
15.	0.1 M Sodium chloride	15.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	15.	12% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
16.	None	16.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	16.	1.0 M Magnesium sulfate heptahydrate
17.	0.1 M Sodium chloride	17.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	17.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000
18.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	18.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	18.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
19.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	19.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	19.	4% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
20.	None	20.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	20.	0.1 M Sodium chloride
21.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	21.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	21.	4% v/v Polyethylene glycol 400
22.	None	22.	0.1 M ADA pH 6.5	22.	1.0 M Ammonium sulfate
23.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	23.	0.1 M ADA pH 6.5	23.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000, 2% v/v 2-Propanol
24.	None	24.	0.1 M ADA pH 6.5	24.	1.0 M Ammonium phosphate dibasic
25.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	25.	0.1 M ADA pH 6.5	25.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
26.	None	26.	0.1 M ADA pH 6.5	26.	12% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
27.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	27.	0.1 M ADA pH 6.5	27.	1.0 M Magnesium sulfate hydrate
28.	0.3 M Lithium sulfate monohydrate	28.	0.1 M ADA pH 6.5	28.	4% v/v Polyethylene glycol 400
29.	0.1 M Ammonium sulfate	29.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	29.	0.5 M Sodium phosphate dibasic dihydrate, 0.5 M Potassium phosphate dibasic
30.	0.1 M Sodium chloride	30.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	30.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
31.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	31.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	31.	18% v/v Polyethylene glycol 400
32.	None	32.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	32.	1.0 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
33.	0.1 M Ammonium sulfate	33.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	33.	18% v/v Polyethylene glycol 400
34.	0.1 M Ammonium sulfate	34.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	34.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
35.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate	35.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	35.	12% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
36.	None	36.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	36.	1.0 M Sodium citrate tribasic dihydrate
37.	0.6 M Magnesium sulfate hydrate	37.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	37.	4% v/v Polyethylene glycol 400
38.	0.6 M Magnesium sulfate hydrate	38.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	38.	4% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
39.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	39.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	39.	0.1 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
40.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	40.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	40.	12% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
41.	0.1 M Ammonium phosphate dibasic	41.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	41.	0.5 M Sodium phosphate dibasic dihydrate, 0.5 M Potassium phosphate dibasic
42.	None	42.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	42.	0.1 M Sodium acetate trihydrate
43.	None	43.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	43.	0.1 M Sodium chloride
44.	0.1 M Ammonium phosphate dibasic	44.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	44.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
45.	0.1 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	45.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	45.	0.4 M Magnesium sulfate hydrate
46.	None	46.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	46.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate
47.	None	47.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	47.	0.5 M Ammonium sulfate
48.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate	48.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	48.	5% v/v Polyethylene glycol 400

◇ Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components: pH with HCl or NaOH.

MembFac contains forty-eight unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
E-mail: tech@hrmail.com
Website: www.hamptonresearch.com

**HAMPTON
RESEARCH**

Solutions for Crystal Growth

© 2000-2006 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or
parts thereof may not be reproduced in any form without
the written permission of the publishers.

Figure 25. Détails des 48 conditions testées grâce au kit "MembFac" (Hampton Research) sur Omp2a.

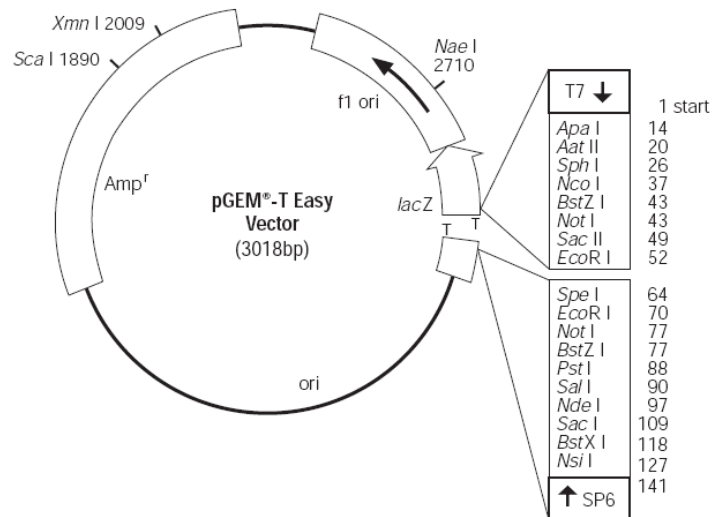


Figure 26. Cartographie de vecteur pGEM-T easy de Promega. En position 52 et 70 se trouvent les deux sites *EcoRI*. Amp^R correspond à la cassette de résistance à l'ampicilline.

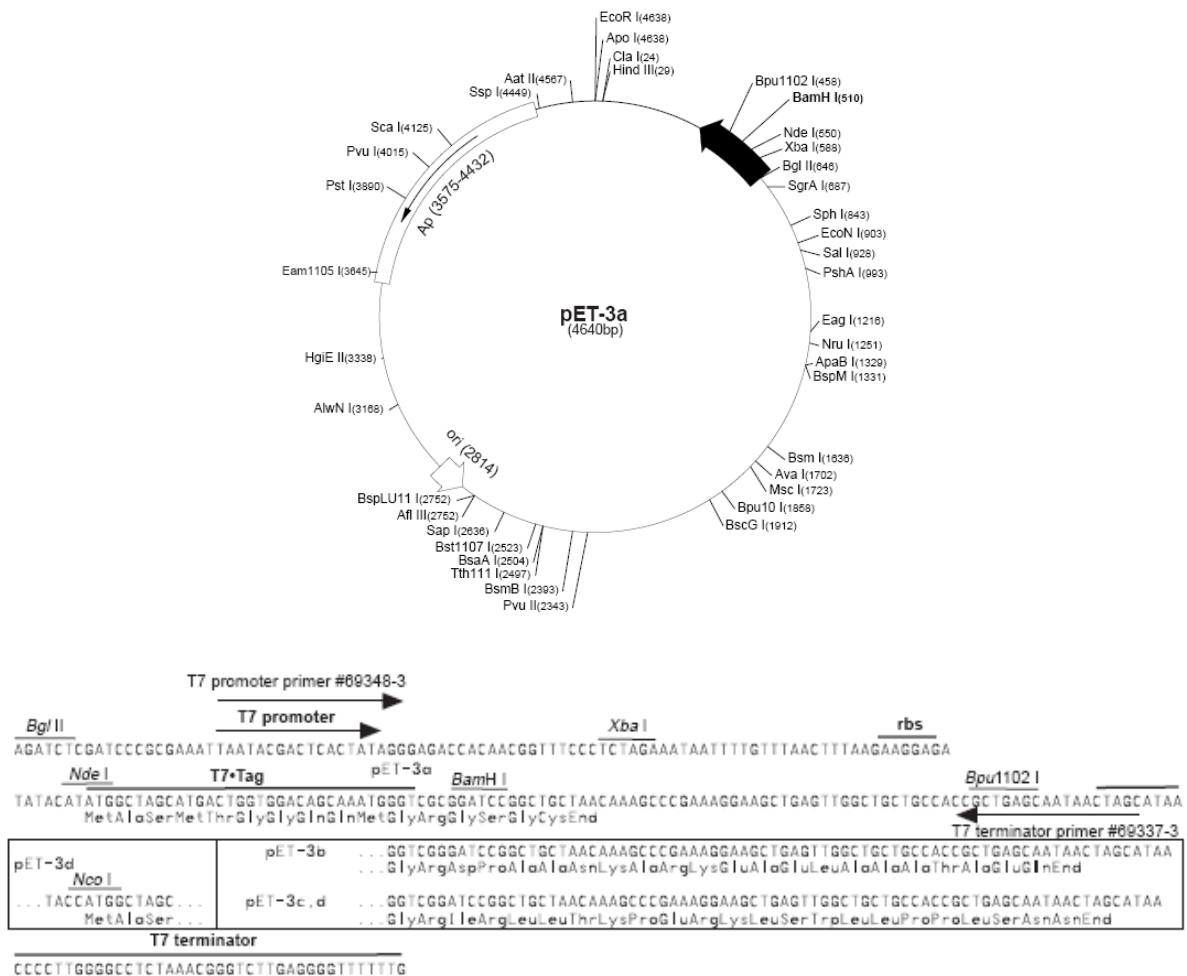


Figure 27. Cartographie du vecteur pET3a de chez Promega et détail de la région de clonage et d'expression de celui-ci. La flèche pleine sur le vecteur correspond à la région détaillée en dessous. La flèche annotée Ap correspond à la séquence codante du gène de résistance à l'ampicilline.

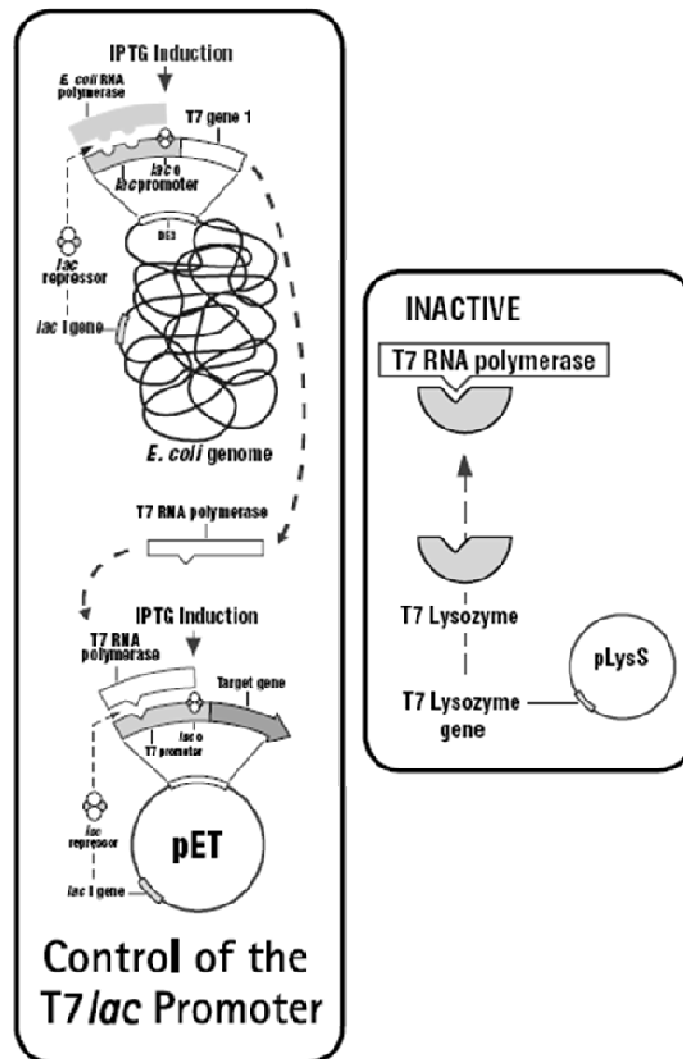


Figure 28. Principe de la surproduction protéique par le système pET en souche BL21(DE3)pLysS. Le génome d'*E. coli* BL21(DE3)pLysS code pour l'ARN polymérase T7. Cette expression est réprimée par le répresseur *lac*. Ce dernier est encodé dans le génome d'*E. coli* et dans le plasmide pET, porteur d'une résistance à l'ampicilline. Le répresseur *lac* réprime aussi l'expression de la protéine d'intérêt. Lorsque l'IPTG est introduit dans la culture, celui-ci lève la répression *lac* et permet donc l'expression de l'ARN polymérase T7 et donc, la production de la protéine d'intérêt qui est sous le contrôle du promoteur T7. Pour éviter la production basale de la protéine d'intérêt en l'absence d'IPTG, la souche d'*E. coli* comprend un autre plasmide, pLysS, codant pour le lysozyme T7, un inhibiteur de l'ARN polymérase T7. Ce plasmide code également pour le gène de résistance au chloramphénicol. (Novagen)

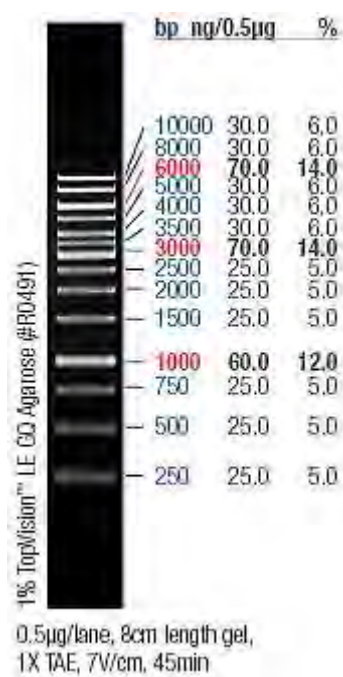


Figure 29. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas). Ce marqueur est celui utilisé en co-migration lors d'électrophorèse sur gel d'agarose afin de connaître les tailles des fragments d'ADN des échantillons testés. Ce marqueur permet également d'estimer la quantité d'ADN.

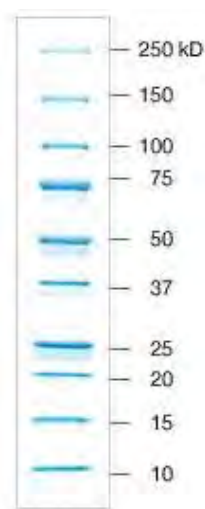


Figure 30. Marqueur Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad). Marqueur utilisé pour les électrophorèses sur gel de polyacrylamide afin d'estimer les tailles des protéines des échantillons testés. kD pour kilodalton.

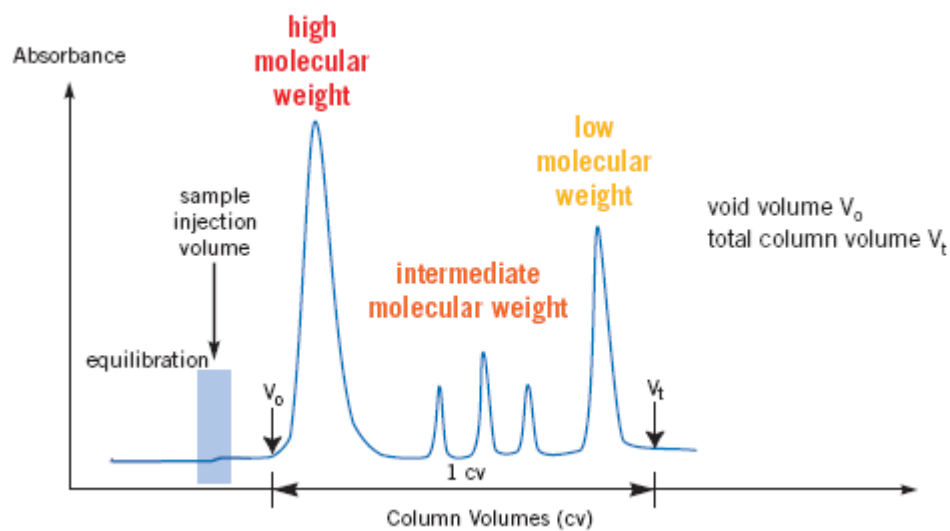


Figure 31. Chromatogramme théorique obtenu par chromatographie d'exclusion. L'absorbance à 280 nm mesurée à la sortie de la colonne indique la sortie des plus grosses molécules suivi par les molécules de tailles intermédiaires et des petites molécules. Schéma issu du manuel de GE Healthcare.

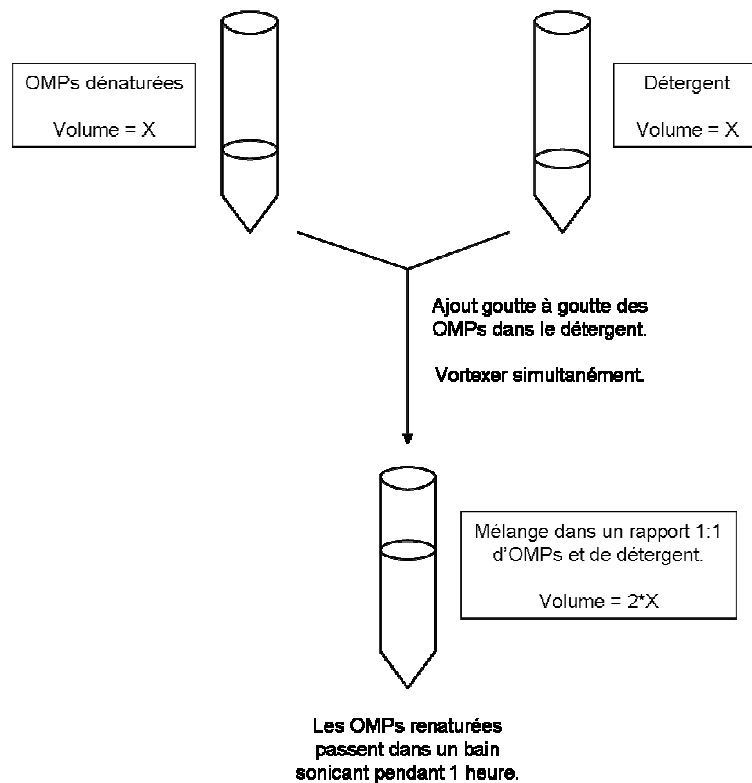


Figure 32. Schéma de la méthodologie utilisée pour la renaturation des OMPs. Au détergent est additionné goutte à goutte les OMPs dénaturées. Le tube de détergent est vortexé simultanément ce qui permet d'homogénéiser les OMPs dans le détergent. Le tout est ensuite sonicé dans un bain pendant 1 heure.

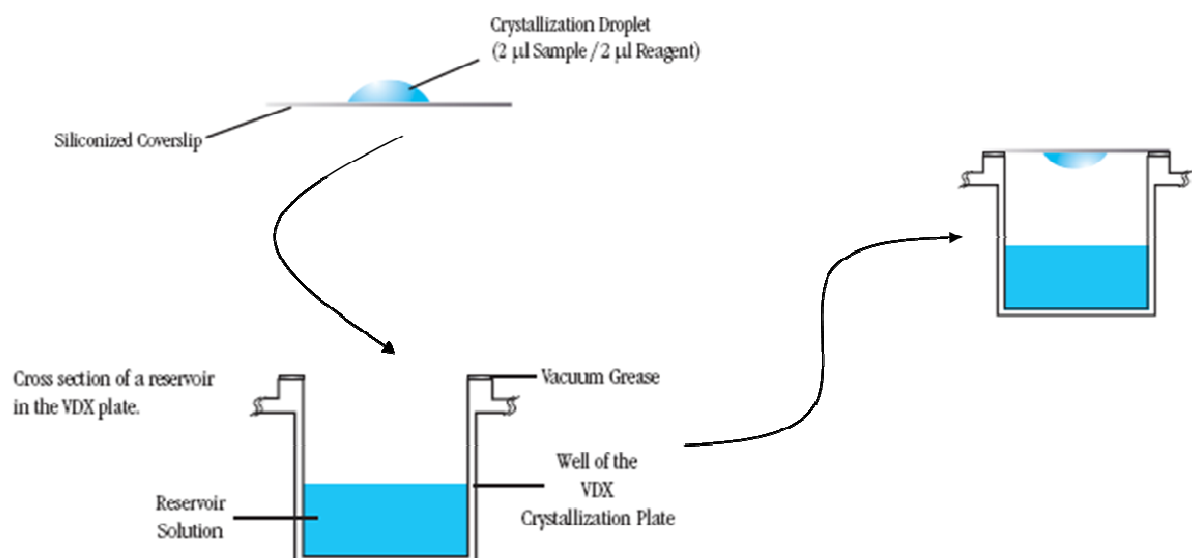


Figure 33. Schéma du protocole de cristallo-genèse. Sur une lame, l'échantillon est mélangé au tampon de la condition correspondante. Le puits contient ce même tampon. Sur le contour du puits est déposé de la graisse destinée à rendre hermétique le montage de la lame sur le puits. Illustrations issues du manuel d'utilisation fourni par Hampton Research.